

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年4月10日 (10.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/029475 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/86, C12P 21/02, C07K 14/74, C12N 5/00, A61K 45/00, 48/00, A61P 31/00, 35/00

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 駒町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/09697

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2002年9月20日 (20.09.2002)

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:
— 國際調査報告書

(26) 国際公開の言語: 日本語

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(30) 優先権データ:
特願2001-301290 2001年9月28日 (28.09.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1丁目 25番 11号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岩本 愛吉 (IWAMOTO,Aikichi) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区 千駄木 5-16-10 Tokyo (JP). 立川 愛 (TACHIKAWA,Ai) [JP/JP]; 〒154-0016 東京都世田谷区 弦巣 1-8-21-208 Tokyo (JP).

(54) Title: MAMMALIAN CELL-INFECTING VIRUS VECTOR ENCODING EPITOPE-BOUND β 2m AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称: エピトープ結合 β 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用

(57) Abstract: A mammalian cell-infecting virus vector encoding epitope-bound β 2m is constructed and thus the epitope-bound β 2m is successfully expressed in a large amount in mammalian cells. Namely, it is intended to provide a mammalian cell-infecting virus vector encoding epitope-bound β 2 microglobulin (β 2m) and utilization thereof. Also, a process for producing an MHC class I/peptide complex with the use of the vector is provided. In particular, a tetramerized MHC class I/peptide complex is useful in detecting epitope-specific CD8-positive T cells. Cells having the above vector transferred thereto are also provided. Moreover, target cells having epitope-bound β 2m produced by the above-described vector added thereto are provided. These cells are recognized by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). The above vector and the polypeptide obtained via the expression of the vector are useful in immunotherapy for infection and cancer and detection and quantification of antigen-specific CTL.

[競業有]

WO 03/029475 A1

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

エピトープ結合 β 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを構築し、哺乳動物細胞で該エピトープ結合 β 2mを大量に発現させることに成功した。本発明は、エピトープ結合 β 2ミクログロブリン（ β 2m）をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用を提供する。また、本発明は、該ベクターを用いたMHC class I/ペプチド複合体の製造方法を提供する。特に4量体化したMHC class I/ペプチド複合体は、エピトープ特異的なCD8陽性T細胞の検出に有用である。また本発明は、該ベクターが導入された細胞を提供する。また、本発明のベクターにより産生したエピトープ結合 β 2mを添加した標的細胞を提供する。これらの細胞は、抗原特異的細胞障害性T細胞（CTL）により認識された。本発明のベクターおよび該ベクターの発現により得られるポリペプチドは、感染症や癌などにおける免疫治療のために、また抗原特異的CTLの検出および定量のために有用である。

明細書

エピトープ結合 β 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター およびその利用

技術分野

本発明は、エピトープ結合 β 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用に関する。

背景技術

MHC (major histocompatibility complex) class I分子は重鎖 (heavy chain; HC) と β 2ミクログロブリン (β 2-microglobulin; β 2m) からなるヘテロダイマーであり、体内にあるほとんどの細胞がその細胞膜表面上に持つ。MHC class I分子はその重鎖によって作られるペプチド収容溝に10アミノ酸前後からなるペプチドを収容することができ、そのMHC class I/ペプチド複合体が細胞性免疫の担い手である細胞傷害性T細胞 (CTL) 上の T cell receptor (TCR) によって認識されることから、MHC class I分子によって提示されるペプチドは「エピトープ (epitope; 抗原決定基)」と呼ばれる。

細胞質内で作られた自己抗原、あるいはウイルス抗原、腫瘍抗原などに由来するペプチド断片は TAP (transporter associated with antigen processing) と呼ばれる粗面小胞体上にあるトランスポーターを介して粗面小胞体へと運ばれ、そこでMHC class I重鎖および β 2mとともに安定なMHC class I/ペプチド複合体を形成する。 β 2-ミクログロブリン分子はMHC class Iの立体構造の安定性の確保とH鎖の細胞表面への輸送に役割を果たしている（日本分子生物学会編「免疫系：認識・分化・増殖」本庶 佑、渡邊 武 編集、丸善株式会社、117-118ページ）。ペプチドを結合していない空のMHC class I分子は37°Cの培養条件では非常に不

安定であることが知られている。

MHC class I分子によって提示されるペプチドであるエピトープは、ある抗原に対する特異的な細胞性免疫を誘導するのに非常に重要な分子であり、HIVをはじめとするウイルス感染や、癌に対する免疫治療としてペプチドワクチンの開発が試みられている。しかしながら多くのウイルス抗原や腫瘍抗原由来の主要なエピトープは、MHC class I分子とペプチドとの結合は弱く、ペプチドのみをワクチンとして使用してもその安定性の低さから一般に効果が期待できない。1998年に抗原性を損なわずMHC class I分子との結合を高めるアミノ酸置換を行った人工のエピトープを用いた、メラノーマ患者に対する臨床研究では効果が認められているが、このような安定性、抗原性に優れたエピトープを同定、開発することは煩雑で困難であり、必ずしも目的のものが得られるわけではない。

また一方で β 2mによるMHC class I分子上のペプチドの安定性の増加という現象が知られており、その β 2mのアジュvant効果を利用した系の開発も行われている。

ところで近年、エピトープペプチドをMHC class I およびII分子あるいは β 2mに融合させたMHC class I/ペプチド複合体等の発現が試みられている (Uger, R. A. and Barber, B. H., 1998, J. Immunol. 160: 1598-1605; White, J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676; Kang, X. et al., 1997, Cancer Res. 57: 202-205; Uger, R. A. et al., J. Immunol. 1999, 162: 6024-6028; 米国特許第5,869,270号)。これらの系では、 β 2mのN末端にリンカーを介してエピトープのペプチド配列を融合させること（エピトープ結合 β 2m; epitope-linked- β 2m）("e/ β 2m"とも表記する）によって、特にMHC class I分子との結合力の弱いエピトープに関してペプチド単独に比して安定性が増加しCTLによる認識も高まることが報告されている。しかし、これらの報告では主として大腸菌発現ベクターが用いられており、哺乳動物細胞感染性のウイルスベクターを用いた例は知られていない。大腸菌において外来蛋白質を大量発現させると、封入体（inclusion body

) を形成し不溶化する場合がしばしば認められる。不溶化した蛋白質は尿素などの変性剤で可溶化し、蛋白質の再フォールディングが行われるが、必ずしも全ての蛋白質が可溶化するわけではなく、操作も煩雑である。また、大腸菌由来の煩雑物の混入も懸念される。

また、哺乳動物発現プラスマドを用いた遺伝子導入は効率が悪く十分な発現が期待できない。さらにプラスマドベクターの発現のためには、プラスマドが核に移行することが必要であるため、核膜の消失する細胞が分裂しているタイミングでなければベクターを発現させることができない欠点を持っている。

MHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的CTLのアッセイにも有用である。個体内での抗原特異的CTLの頻度の定量には従来、限界希釈アッセイ (limiting dilution assay) という方法が用いられてきたが、これはインピトロでの長期の培養が必要であることと、感度が悪いことから、1996年に簡便で感度のよい "MHC class I/ペプチド・テトラメリック複合体 (テトラマー)" [MHC class I/peptide tetrameric complex (tetramer)] が開発された (Altman J. D. et al., Science 274: 94-96 (1996))。これはMHC class I/ペプチド複合体をbiotin-avidinの結合を用いて4量体化し、さらに蛍光標識を付加したもので、FACSによる解析に利用される。この方法は個体から分離した末梢血単核球をそのまま用いて測定することができるため、簡便で個体内の頻度を直接反映する上、非常に感度がよく、さらに特異性も高いことが確認されている (Wilson, J. D. K. et al., J. Exp. Med. 188: 785-790 (1998); Kuroda, M. J. et al., J. Exp. Med. 187: 1373-1381 (1998))。現在ヒトのMHC class I分子について用いられているMHC class I/ペプチド複合体は、大腸菌にて重鎖(HC)および β 2m蛋白質を別々に発現させ、精製し、さらに合成ペプチドを用いた3者によるインピトロフォールディングにてMHC class I/ペプチド複合体を作製している。

それに対してマウスのMHC class I分子についてバキュロウイルスベクターを用い、昆虫細胞由来のMHC class I/ペプチド複合体の作製が報告されている (White,

J. et al., 1999, J. Immunol. 162: 2671-2676)。この系ではMHC class I重鎖、エピトープ結合 $\beta 2m$ を各々発現するバキュロウイルスを重感染させることによって、その細胞内でMHC class I/ペプチド複合体が作られる。しかし、哺乳動物細胞感染性のウイルスベクターを用いた例は知られていない。バキュロウイルスベクターは昆虫細胞（例えばSf9細胞）で有効なプロモーターの下流で外来遺伝子を発現するシステムで（特表平6-502990）あるため、哺乳類由来の細胞を利用することができない。また、PunnonenらはDNAシャッフルリングに用いる遺伝子ワクチンベクターを開示しているが、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターについては知られていない（Punnonen, J. 他、Genetic Vaccine Vector Engineering、米国特許出願第20010006950号）。

発明の開示

本発明は、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用を提供する。

本発明者らは、エピトープ結合 $\beta 2m$ およびMHC class I/ペプチド複合体を哺乳動物細胞で大量発現させる系を確立するため、哺乳動物細胞感染性のウイルスベクターを用いた発現系の構築を試みた。この目的のために、広い哺乳動物種に感染可能であり、導入遺伝子の極めて高い発現を得ることができる組み換えセンダウイルス（rSeV）を用いて、SeVによるMHC class I/ペプチド複合体、及びエピトープ結合 $\beta 2m$ の発現系を構築した。

本発明者らは、HIV-1 NefおよびEnvタンパク由来のエピトープを例に、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するSeVベクターを構築した。これを哺乳動物に導入し、分泌型蛋白質の形でエピトープ結合 $\beta 2m$ を大量に回収することに成功した。回収されたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、細胞表面上のMHC class I重鎖と結合してMHC class I/ペプチド複合体を形成し、CTLに効率良く抗原を提示できることが判明した。このことから動物感染性ウイルスベクターにより產生されるエピトープ結合 $\beta 2m$ は、

タンパク製剤として有用であることが示された。ベクター導入細胞から產生されたエピトープ結合 $\beta 2m$ を回収・精製すれば、臨床応用に有用な抗原特異的細胞性免疫誘導剤を得ることが可能である。

また、本発明者らは、MHC class I重鎖を発現するSeVベクターを構築し、これとエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現SeVベクターを哺乳動物細胞に重感染させてMHC class I/ペプチド複合体を回収・精製した。さらに、MHC class I重鎖の膜結合領域を欠失させた分泌型MHC class I重鎖にビオチン化基質ペプチドを付加した分子をSeVベクターにより発現させ、得られたMHC class I/ペプチド複合体をビオチン化した後、RPE標識アビシンを介して結合させ、MHC class I/ペプチドテトラマーを製造した。このMHC class I/ペプチドテトラマーは、CTLの検出および定量に好適に用いられる。このテトラマーは動物細胞由来であるため糖鎖が付加され、大腸菌由来のテトラマーに比して感度の向上などが期待される。

HLA-A*2402を発現するSeVとHIV-1 Nefタンパク由来のエピトープが結合している $\beta 2m$ を発現するSeVベクターを共導入した細胞は、HIV-1 Nefタンパク由来の合成エピトープペプチドをパルス投与した場合と同等またはそれ以上の効率で抗原特異的CTLに認識されることが判明した。また、SeVベクター導入細胞から回収したエピトープ結合 $\beta 2m$ の効果を調べたところ、エピトープ結合 $\beta 2m$ を標的細胞の培養液に添加することによって、標的細胞に対する抗原特異的CTLの反応を誘導することに成功した。これらの知見は、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが、抗原特異的な免疫反応を誘導するためのインビボまたはエクスピボにおける遺伝子治療に有用であることを示している。目的のMHC class I/ペプチド複合体を個体内で產生させることができれば、単なるペプチドワクチンなどに比して効果の高い免疫治療を実現することが可能と考えられる。

このように本発明者らは、哺乳動物細胞において効率的にエピトープ結合 $\beta 2m$ を產生させる方法を確立し、このエピトープ結合 $\beta 2m$ を含む分泌型および膜結合

型のMHC class I/ペプチド複合体を製造した。さらに本発明者らは、個体内での抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）の検出および定量に有用なMHC class I/ペプチドテトラマーの作製において新しいシステムを開発した。また本発明者らは、上記の生産系を用いて調製したエピトープ結合 $\beta 2m$ 蛋白質を細胞表面のMHC class Iと結合させ抗原特異的CTLへの抗原提示を行った。さらに、エピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターおよびMHC class I重鎖発現ウイルスベクターを標的細胞に重感染させ、抗原特異的CTLによる認識を誘導する系を確立した。

本発明において提供されるベクターを使用すれば、哺乳動物細胞で所望のエピトープ結合 $\beta 2m$ を大量に発現させることが可能であり、得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ およびMHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的CTLの検出および定量のために、またエピトープ結合 $\beta 2m$ 精製蛋白質を用いたMHC class Iによる抗原提示のために、さらにはインピボおよびエクスピボでのベクター導入を介して、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために極めて有用である。特に本発明のベクターは、ウイルスやバクテリア等の感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などに好適に用いられる。

本発明は、エピトープ結合 $\beta 2m$ をコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターおよびその利用に関し、より具体的には、

- (1) エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター、
- (2) 哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、(1)に記載のウイルスベクター、
- (3) パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、(2)に記載のウイルスベクター、
- (4) エピトープが抗原提示細胞により提示されたエピトープペプチドのアミノ酸配列またはその部分を含む、(1)から(3)のいずれかに記載のウイルスベクター、

(5) エピトープがHIV-1のウイルス蛋白質の部分ペプチドである、(1)から(4)のいずれかに記載のウイルスペクター、

(6) エピトープが配列番号：24または26に記載のアミノ酸配列またはその部分を含む、(5)に記載のウイルスペクター、

(7) エピトープが癌抗原の部分ペプチドである、(1)から(4)のいずれかに記載のウイルスペクター、

(8) エピトープと β 2mの間に配列番号：13に記載のアミノ酸配列またはその繰返しを含む、(1)から(7)のいずれかに記載のウイルスペクター、

(9) エピトープ結合 β 2mの生産方法であって、

(a) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスペクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、エピトープ結合 β 2mを回収する工程、を含む方法、

(10) (9)に記載の方法により生産されたエピトープ結合 β 2m、

(11) エピトープ結合 β 2mを含む、ヘテロダイマーの生産方法であって、

(a) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスペクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したヘテロダイマーを回収する工程、を含む方法、

(12) MHC class I 重鎖、およびエピトープ結合 β 2mを含む、MHC class I/ペプチド複合体の生産方法であって、

(a) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスペクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したMHC class I/ペプチド複合体を回収する工程、を含む方法、

(13) 前記哺乳動物細胞に、MHC class I 重鎖を発現するウイルスペクターを

導入する工程をさらに含む、(12)に記載の方法、

(14) MHC class I 重鎖が分泌型である、(13)に記載の方法、

(15) MHC class I 重鎖がビオチン化基質ペプチドを含む、(14)に記載の方法、

(16) MHC class I 重鎖がA24拘束性HLA class I 重鎖である、(13)から(15)のいずれかに記載の方法、

(17) A24拘束性HLA class I 重鎖がA*2402由来である、(16)に記載の方法、

、
(18) ビオチン化基質ペプチドを含むMHC class I 重鎖をビオチン化する工程、およびビオチン化MHC class I 重鎖をアビジンの存在下で会合させる工程をさらに含む、(15)に記載の方法、

(19) (12)から(18)のいずれかに記載の方法により生産されたMHC class I/ペプチド複合体、

(20) 4量体である、(19)に記載のMHC class I/ペプチド複合体、

(21) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクター、(10)に記載のエピトープ結合β2m、あるいは(19)または(20)に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤、

(22) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクター、(10)に記載のエピトープ結合β2m、あるいは(19)または(20)に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む医薬組成物、

(23) (1)から(8)のいずれかに記載のウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞、

(24) (10)に記載のエピトープ結合β2mを細胞表面に有する細胞、

(25) MHC class I 重鎖をコードする遺伝子が外的に導入されている、(23)または(24)に記載の細胞、

(26) MHC class I 重鎖が膜結合型である、(25)に記載の細胞、

- (27) MHC class I 重鎖が分泌型である、(25)に記載の細胞、
- (28) 細胞が樹状細胞である、(23)から(27)のいずれかに記載の細胞
 - 。
- (29) (23)から(28)のいずれかに記載の細胞を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤、
- (30) (23)から(28)のいずれかに記載の細胞を含む医薬組成物、
- (31) (19)または(20)に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的Tリンパ球の検出薬、に関する。

本発明において「エピトープ」とは、免疫細胞により認識され得るペプチドを言う。免疫細胞としては、T細胞、B細胞、NK細胞、またはNKT細胞などが挙げられる。本発明において好ましいエピトープは、T細胞により認識されるペプチドである。エピトープは、抗原提示細胞により提示されたペプチドのみならず、免疫細胞により認識され得る限り所望のペプチドであってよく、例えば、人工的に作製したアミノ酸配列からなるペプチドをエピトープとして用いることもできる。より好ましくは、エピトープは抗原提示細胞(APC)により提示されたペプチドまたはその部分を含むペプチドである。本発明においてエピトープとなる蛋白質またはペプチドの「部分」は、通常、連続した8アミノ酸以上を含む部分である。好ましくは、連続した9アミノ酸以上、より好ましくは連続した10以上、12以上、または15以上のアミノ酸を含む部分である。

本発明は、エピトープ結合 β 2mをコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを提供する。哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターとしては特に制限はなく、所望のウイルスベクターを利用することができる。本発明の哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞以外の細胞に感染する能力を有していてもよい。ベクターとしては、宿主に対する毒性が低く、導入遺伝子の高い発現が得られるものが好ましい。本発明のベクターとして用いられ得るウイルスベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単

純ヘルペスウイルスペクター、レトロウイルスペクター、レンチウイルスペクター、セムリキ森林ウイルスペクター、シンドビスウイルスペクター、ワクシニアウイルスペクター、フォウルポックスウイルスペクター、センダイウイルスペクターなどが挙げられるがこれらに制限されない。これらのベクター系を用いて、エピトープ結合 β 2mを発現する組み換えウイルスペクターを構築することができる。なお、本明細書において、「組み換え」ウイルスペクターとは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスペクターを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。より具体的には、例えば人為的にポリヌクレオチド鎖が繋ぎ替えられたり、あるいは新たに生成されたポリヌクレオチドである。「組み換え」ウイルスペクターは、例えば遺伝子操作により構築されたウイルスペクターまたはそれを増幅して得られるウイルスペクターが含まれる。組み換えウイルスペクターは、例えば、組み換えウイルスcDNAを宿主細胞で発現させ、ウイルス粒子を再構成して生成することができる。

組み換えウイルスペクターは当業者に周知の方法に従って調製することができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスペクターの作製は、斎藤らの方法 (Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-24頁；鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994、43-58頁、羊土社) に従い、例えばアデノウイルス(Ad)5型ゲノムのほぼ全長からE1及びE3領域を除く31kbのAdDNAを持つ42KbのコスミドpAdex1cw (鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁) を、適当な制限酵素例えばSwaI等で切断し、ゲルfiltration等にて適宜脱塩精製し、外来遺伝子発現ユニットをT4リガーゼ等による連結反応に供した後、酵素を熱失活し、ゲルfiltrationにて脱塩し、SwaIによる切断反応を行う。切断産物はフェノールによる酵素失活処理後脱塩し、再びSwaIで切断する。その一部についてギガパックXLキット (ストラタジーン社、米国) 等によるインピトロ・パッケージングを行い、連結産物を大腸菌に導入し得られ

たアンピシリン耐性形質転換株のいくつかについてコスミドを調製し、制限酵素消化によりその構造を調べ、外来遺伝子発現ユニットが目的の方向（E1A、E1Bの転写と逆方向）に挿入された組換えコスミドを単離する。一方で、E1及びE3領域を欠くアデノウィルス5型（Ad5 d1X株）のDNA-末端蛋白質複合体（DNA-TPC）を斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により調製する。これを例えれば、制限酵素EcoT22Iで消化し、ついでゲル濾過等により脱塩精製する。該コスミドとEcoT22I消化断片を混合し、セルフェクトキット（ファルマシア社、スウェーデン）等を用いて、293細胞に導入する。翌日、トランスフェクションした293細胞を懸濁し、その懸濁液、および10倍ないし100倍希釀液（293細胞懸濁液にて希釀）を96穴プレートに撒く。約2週間後に、293細胞内での組換えによって生じた組換えアデノウィルスの増殖が見られたウェルから、死滅細胞を含む培養液を取り出す。それを数回凍結融解し、アデノウィルス粒子を細胞から放出させる。その遠心上清液（1次ウィルス液）を、24穴プレートにまいた293細胞に感染させる。3日後に死細胞を含む培養液を取り出し、一部は1次ウィルス液作成の要領で凍結融解し、遠心上清液を得る（2次ウィルス液）。残りの培養液を遠心し、細胞を得る。それよりDNAを調製し、制限酵素切断によって組換えアデノウィルスDNAの構造を検討し、目的の構造が確認されたクローンを選択する。その2次ウィルス液を用いて、より多量の293細胞に感染させ、その培養液を同様に凍結融解、遠心し、3次ウィルス液を得る。3次ウィルス液について、斎藤らの方法（鐘ヶ江ら、1994、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、43-58頁、羊土社）により、力価を測定し、ベクターとして利用できる（Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻、1320-1324頁；Kanegaeら、1996、Acta Paediatr. Jpn.、38巻、182-188頁）。

他にも、例えばレトロウィルスベクター（脇本ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁）、アデノ随伴ウィルスベクター（玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁）などを用いることができる。これらは既に確立された方

法で、効率的にベクターを生産できることが公知となっている。

哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のベクターを製造するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピローマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られている。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知られている。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が知られている。

得られたウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入することにより、エピトープ結合 β 2mが発現し、この細胞または培養上清から目的のエピトープ結合 β 2mを得ることができる。回収されたエピトープ結合 β 2mは、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために有用である。例えば、エピトープ結合 β 2mを抗原提示細胞に添加し、このエピトープを提示させることができる。また、抗原提示細胞にエピトープ結合 β 2m発現ウイルスベクターを導入すれば、効率的に所望のエピトープを提示させることができる。エピトープは β 2mの所望の部位に結合させてよいが、例えば分泌後の β 2m分子のN末端となるようにエピトープを結合させることが好ましい。このためには、 β 2mの分泌シグナル配列に続いてエピトープを結合し、場合によりスペーサー配列を介して、 β 2m蛋白質を連結した融合蛋白質を製造すればよい。用いられる β 2mとしては特に制限はなく、所望の哺乳動物の β 2m分子を用いることができる。ヒトへの適用のためにはヒト β 2mが好ましい。ヒト β 2m遺伝子は例えば実施例に記載したようにして単離することができる。

また、哺乳動物細胞にエピトープ結合 β 2mと分泌型（または可溶型とも言う）のMHC class I重鎖の両者の遺伝子を導入すれば、培養上清にMHC class I/ペプチド複合体が分泌され容易に回収することができる。分泌型MHC class I重鎖は、ウイルスベクターによって哺乳動物細胞に導入してもよいし、細胞の染色体DNAにこれをコードする遺伝子を組み込んだ上で発現させてもよい。分泌型のMHC class I重鎖にピオチン化基質ペプチドを付加しておけば、ピオチン化したMHC class I/

ペプチド複合体を、アビシンを用いて4量体化することが可能である。このようなテトラマーは、特にCTLの検出および定量に有用である。

エピトープ結合 $\beta 2m$ と膜結合型のMHC class I重鎖の両者の遺伝子を導入すれば、細胞表面上に大量のMHC class I/ペプチド複合体が発現される。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対し、優れた抗原提示能を有している。

ウイルスベクターを用いてMHC class I 重鎖を発現させる場合、用いるベクターとしては、上記のエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターと同様、特に制限はなく、所望のウイルスベクターを用いることができる。また、エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターにMHC class I 重鎖をコードする遺伝子を組み込み、同一のベクターからエピトープ結合 $\beta 2m$ とMHC class I 重鎖を共発現させることもできる。本発明のベクターには、エピトープ結合 $\beta 2m$ に加え他の外来遺伝子を発現する共発現ベクターも含まれる。MHC class I 重鎖としては、特に制限はないが、ヒトへの適用のためにはヒトのMHC class I分子（HLA）が好ましい。実施例において本発明者らは、MHC class I分子としてA24拘束性HLA class I 重鎖を用い、エピトープとしては、A24拘束性HLA class I分子によって提示されるHIV-1由来のエピトープを用いた。ヒトのMHC class I分子はヒト白血球抗原（human leukocyte antigen; HLA）と呼ばれ、非常に多様性に富んでいる。その中でHLA-A*2402という遺伝子型は日本人の約7割が持つ。本発明において用いられるMHC class I重鎖としては、A24拘束性HLA class I 重鎖、特にHLA-A*2402が、日本人への適用を考えた場合に好ましい。患者のMHC型に合わせて $\beta 2m$ に融合させるエピトープおよび／またはMHC class I分子を選択することにより、テーラーメイドの医療が可能となると考えられる。

本発明者らは、また、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いると、細胞において所望の分泌型のマルチマー（多量体）蛋白質複合体を極めて効率的に製造することが可能であることを見出した。特に、本発明に従い哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いて、分泌型のホモまたはヘテロダイマーおよびホモま

たはヘテロトライマーを高い効率で製造することが可能である。例えば内因的には細胞膜上に存在するヘテロマー蛋白質であっても、実施例で行ったように、その膜貫通領域を欠失させた蛋白質を該ウイルスベクターで発現させることにより、細胞外に分泌させることが可能である。本発明に従ってダイマーまたはトライマー等の分泌型マルチマーの製造を行う場合には、マルチマーの成分となる蛋白質を、哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いて発現させる。これらの成分蛋白質は全てを哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターで発現させてもよいし、細胞において内因性に幾つかの成分が十分量発現している場合などにおいては、発現量の少ない成分など一部の成分蛋白質のみを哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを用いて発現させてもよい。この方法を用いて製造する分泌性マルチマーとして最も好ましいものの1つはMHC class II複合体である。これは、 α および β の2本鎖の重鎖からなるヘテロダイマーで、 α 鎖または β 鎖のどちらかに、上記のエピトープ結合 β 2mまたはエピトープ結合MHC class I重鎖と同様にエピトープを融合させ、エピトープ結合 β 2mまたはエピトープ結合MHC class I重鎖の場合と同様の方法に従って複合体を製造することが可能である。また、本方法を用いて製造する分泌性マルチマーとしてはT細胞受容体なども好ましい。これらの他には、例えばヘテロまたはホモダイマーあるいはヘテロまたはホモトライマーの形態をとる種々のサイトカインおよびケモカイン等が挙げられる。具体的には、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-3、IL-5、およびGM-CSFなどのヘテロダイマーまたはヘテロトライマー、およびNK受容体のようなホモダイマーなどが挙げられるが、これらに制限されない。すなわち本発明は以下の発明も提供する。

〈1〉 分泌性マルチマーの成分を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター。

〈2〉 哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターがパラミクソウイルスベクターである、〈1〉に記載のウイルスベクター。

〈3〉 パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〈2〉に記載のウイルス

ベクター。

〈4〉 分泌性マルチマーが、分泌性ホモまたはヘテロダイマーまたは分泌性ホモまたはヘテロトライマーである、〈1〉から〈3〉のいずれかに記載のウイルスベクター。

〈5〉 分泌性マルチマーが、MHC class II複合体、T細胞受容体、NK受容体、インターロイキン(IL)-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-3、IL-5、およびGM-CSFからなる群より選択される分泌性マルチマーである、〈4〉に記載のウイルスペクター。

〈6〉 分泌性マルチマーが、エピトープが結合されたMHC class II複合体である、〈5〉に記載のウイルスペクター。

〈7〉 分泌性マルチマーの生産方法であって、(a) 〈1〉から〈6〉のいずれかに記載のウイルスペクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、分泌性マルチマーを回収する工程、を含む方法。

〈8〉 〈7〉に記載の方法により生産された分泌性マルチマー。

〈9〉 〈1〉から〈6〉のいずれかに記載のウイルスペクターが導入された哺乳動物細胞。

本発明において特に好適な哺乳動物細胞感染性ウイルスペクターは、パラミクソウイルスペクターである。「パラミクソウイルスペクター」とは、パラミクソウイルスに由来し遺伝子を宿主細胞に導入するベクター（担体）を指す。パラミクソウイルス科に属するセンダイウイルス (SeV) は最近、遺伝子導入ベクターとして開発が進められている (Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-598, 1997; 国際公開番号97/16538号および国際公開番号97/16539号)。SeVベクターは毒性が低く、導入した遺伝子から発現される蛋白質量が極めて高い。また、ベクター内の遺伝子が宿主染色体へ導入されないため、安全性にも優れている。SeVベクターのゲノムの安定性は高く、異種遺伝子発現の結果ではウイルスを連続多代

継代しても殆ど塩基の変異が認められず、挿入異種遺伝子を長期間に渡って安定に発現する事が示されている (Yu, D. et al., *Genes Cells* 2, 457-466 (1997))。また、カプシド構造タンパク質を持たないことによる導入遺伝子のサイズまたはパッケージングの柔軟性 (flexibility) など性質上のメリットがある。複製能を有するSeVベクターは、外来DNAを少なくとも4 kbpまで導入可能であり、転写ユニットを付加することによって2種類以上の遺伝子を同時に発現する事が可能である。SeVのレプリコンをベースにしたベクターは複製されたウイルスが周囲の細胞にも再感染し、感染細胞の細胞質で多コピーに複製されたRNPが細胞の分裂に伴い娘細胞にも分配されるため持続発現が期待される。また、SeVベクターは非常に広い組織適用範囲を持つ。

また、安全性の面においても、ヒト病原性が否定されているためパラミクソウイルスベクターはヒトへの遺伝子治療の臨床試験に好適に用いられることが示唆される。第一に、プラスミドDNA等による導入遺伝子の発現は、多くの場合、導入したDNAの核局在化または核膜の消失が必要であることが、遺伝子発現の成功率を低下させる主要な障害になっている。しかし、例えばセンダイウイルスなどの場合、外来遺伝子の発現は、細胞質内において細胞性チューブリンおよび自身が持つRNAポリメラーゼ (L蛋白質) の両方によってウイルスゲノムの複製に伴って駆動される。これは、センダイウイルスが宿主の染色体と相互作用しないことを示しており、染色体異常による癌化や不死化などの安全面における問題が生じないと考えられる。第二に、センダイウイルスは齧歯類にとって病原性で肺炎を生じることが知られているが、ヒトに対しては病原性がない。これはまた、野生型センダイウイルスの経鼻的投与によって非ヒト靈長類において重篤な有害作用を示さないというこれまでの報告によっても支持されている (Hurwitz, J. L. et al., *Vaccine* 15: 533-540, 1997)。センダイウイルスのこれらの特徴は、センダイウイルスベクターが、ヒトの治療へ応用しうることを示唆し、センダイウイルスベクターが、エピトープ結合 β 2mのインピボまたはエクスピボでの発現を目

的とした遺伝子治療における有望な選択肢の一つとなることを支持するものである。

本発明のパラミクソウイルスペクターはリボ核タンパク質（RNP）であってもよく、また、感染力を持つウイルス粒子であってもよい。ここで「感染力」とは、組み換えパラミクソウイルスペクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、接着した細胞の内部にベクター内部の遺伝子を導入することができる能力を言う。本発明のパラミクソウイルスペクターは、複製能を有していてもよく、あるいは複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスペクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が產生されることを指す。宿主細胞としては、例えばLLC-MK2またはCV-1等が挙げられる。以下にパラミクソウイルスペクターを例に本発明を詳細に説明するが、本発明のウイルスペクターとしてはパラミクソウイルスペクターに制限されず、以下の記載を基にして他のウイルスペクターも同様に作製することができる。

本発明において「パラミクソウイルス」とはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) のセンダイウイルス (Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス (Mumps virus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、RSウイルス (Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス (rinderpest virus)、ジステンペーウイルス (distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1, 2, 3型等が挙げられる。本発明のウイルスは、好ましくはパラミクソ亜科（レスピロウイルス属、ルプラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む）に属するウイルス、より好ましくはレスピロウイルス属 (Respirovirus)（パラミクソウイルス属 (*Paramyxovirus*) とも言う）に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なレスピロウイルス属

ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス1型 (HPIV-1) 、ヒトパラインフルエンザウイルス3型 (HPIV-3) 、ウシパラインフルエンザウイルス3型 (BPIV-3) 、センダイウイルス (Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス1型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型 (SPIV-10) などが含まれる。本発明のパラミクソウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子 (J. Virol. 68, 8413-8417(1994)) 等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスペクターを製造するための材料として使用することができる。

パラミクソウイルスのウイルスタンパク質をコードする遺伝子としては、NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子が含まれる。「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキアプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。パラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある

。

レスピロウイルス属	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルプラウイルス属	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
モービリウイルス属	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばパラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) のレスピロウイルス (Respirovirus) 属に分類されるセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセション番号は、NP遺伝子については M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218、P遺伝子については M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M遺伝子については D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056、F遺伝子については D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X001

52, X02131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。なお、本発明において「遺伝子」とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。遺伝子の由来に制限はなく、天然または人為的に設計された配列に由来するものであり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。

本発明に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、特に制限はないが、好適なパラミクソウイルスベクターとして、例えば、複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、N（スクレオキャプシド）、P（ホスホ）、M（マトリックス）、F（フェージョン）、HN（ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ）、およびL（ラージ）蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能な本発明のベクターを製造することができる。ゲノム内にエピトープ結合 β 2mおよび/またはMHC class I重鎖をコードする遺伝子を挿入することにより、これらの蛋白質を発現するベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルスベクターにおいては、ベクター上のウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。

また、本発明に用いるパラミクソウイルスベクターとしては、野生型パラミクソウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センダイウイルスベクターを再構成させる場合、NP、P/CおよびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要だと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに含まれていなくてもよい。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ベクターの再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコードする遺伝子を有す

る宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、パラミクソウイルスペクターが細胞に伝播してゆくためには、M、FおよびHN遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、パラミクソウイルスペクターをRNPとして調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNPに含まれるゲノムに、M、FおよびHN遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。感染性ウイルスを產生するRNPベクターとしては、例えばN、P、M、F、HN、およびL遺伝子をコードするウイルスゲノムRNAと、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質とを含むRNPが挙げられる。このようなRNPを細胞内に導入すると、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質の働きによりウイルスゲノムが発現、複製され、感染性ウイルスペクターが増幅する。このように、パラミクソウイルスペクターの再構成の過程などで形成されるRNPをLLC-MK2細胞などの宿主細胞に導入して培養することにより、パラミクソウイルスペクターを増幅することもできる。この過程は、(a) パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNA、並びにNP、P/C、およびL蛋白質からなる複合体を細胞に導入する工程、および(b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収する工程、を含む。

RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランسفエクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169)などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。複製

型ウイルスの場合、產生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体（例えばマウスなどの哺乳動物）などに再感染させて増幅または継代することができる。

また、M、Fおよび/またはHN遺伝子が含まれていないパラミクソウイルスペクターも、本発明のパラミクソウイルスペクターとして用いることができる。このようなウイルスペクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスペクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスペクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および/またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組み換えパラミクソウイルスペクターゲノムを発現するプラスミドを、F蛋白質の発現ベクターならびにNP、P/CおよびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、ウイルスペクターの再構成を行うことができる（国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070）。また、例えば、F遺伝子が染色体に組み込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、本発明のウイルスペクターとして、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロープに含むベクターを作製することもできる。例えば、ウイルス再構成の際に、ベクターのベースとなるウイルスのゲノムがコードするエンベロープタンパク質以外のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、所望のエンベロープ蛋白質を有するウイルスペクターを製造することができる。このようなタンパク質に特に制限はない。

い。例えば、他のウイルスのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス (VSV) のGタンパク質 (VSV-G) を挙げることができる。本発明のウイルスペクターには、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むシードタイプウイルスペクターが含まれる。

また、本発明のウイルスペクターは、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスペクターの再構成時に、ウイルスゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などの遺伝子）の発現により供給されてもよい。

また、本発明のウイルスペクターは、例えばベクターに由来するウイルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えばバラミクソウイルスペクターにおいては、複製因子であるNP遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン (hemagglutinin) 活性とノイラミニダーゼ (neuraminidase) 活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リポソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に

に関する抗原提示能を弱めたパラミクソウイルスを作製することもできる。

またパラミクソウイルスペクターにおいては、アクセサリー遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現や複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する（Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., WO01/04272, EP1067179）。このような弱毒化ベクターは、本発明のパラミクソウイルスペクターとして特に好適である。

エピトープ結合 β 2mまたはMHC class I重鎖などの外来遺伝子を含む組み換えパラミクソウイルスペクターは、上記のパラミクソウイルスペクターゲノムにこれらの遺伝子を挿入することによって得られる。 β 2mおよびMHC class I重鎖としては、天然型蛋白質をコードする遺伝子を用いてもよく、また天然型蛋白質と同等の機能、すなわち、MHC class I/ペプチド複合体の形成活性、あるいはこの複合体の細胞傷害性T細胞による認識またはこの複合体によるCTLの活性化などの機能を有する蛋白質をコードする限り、欠失、置換または挿入により天然型蛋白質を改変した蛋白質をコードする遺伝子を用いてもよい。ウイルスペクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスペクターDNAにおいては、転写終結(E)配列と転写開始(S)配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830）。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子（NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子）の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S配列（転写開始配列—介在配列—転写終結配列）またはその部分を挿入し、各遺伝子の間にE-I-S配列のユニットが配置されるようにする。あるいは、IRESを介して外来遺伝子を挿入し得る。

挿入した遺伝子の発現量は、その遺伝子の上流に付加する転写開始配列の種類

により調節することができる（国際公開番号 WO01/18223）。また、遺伝子挿入の位置、および遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスにおいては、挿入位置がウイルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3' 端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、NP遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が高い。挿入遺伝子の高い発現を得るために挿入遺伝子をNP遺伝子の上流（ネガティブ鎖においては3' 側）またはNP遺伝子とP遺伝子の間など、上流領域（ネガティブ鎖ゲノムにおいて3' 側）に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5' 端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5' 側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5' 隣接部位）、またはL遺伝子の上流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3' 隣接部位）に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。例えば、高力価ウイルスペクターの投与による導入遺伝子の高発現が毒性を示す場合は、投与するウイルス力価を制限することができる他、例えばベクターにおける挿入遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖のなるべく5' 側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、個々のウイルスペクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な発現量または治療効果が得られるすることも可能である。

一般に、細胞毒性を示さない限りにおいて、エピトープ結合 β 2mの高い発現が得られれば、効率的な蛋白質の產生や免疫誘導などにおいて有利と考えられるため、エピトープ結合 β 2mをコードする遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3' 端近くに挿入することが好ましい。好適なベクターの例としては、エピトープ結合 β 2mをコードする遺伝子が、パラミクソウイルス

ベクターのネガティブ鎖ゲノムにおいて、該パラミクソウイルスのウイルス蛋白質のいずれよりも3'側に配置されているベクターが挙げられる。例えばN遺伝子の上流（ネガティブ鎖においてN遺伝子コード配列の3'側）に外来遺伝子が挿入されたベクターが好ましい。あるいは、N遺伝子のすぐ下流に挿入してもよい。

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、ゲノムをコードするベクター-DNA中の挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができます。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明のベクターは、このようにエピトープ結合 β 2m遺伝子を挿入した以外の位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。このような外来遺伝子としては制限はない。例えばケモカインまたはサイトカイン遺伝子であってもよく、また、MHC class I重鎖の遺伝子、その他の遺伝子であってもよい。

例えば外来遺伝子を有する組み換えセンダイウイルスベクターは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ μ l以上の濃度で電気泳動的に单一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子を、NotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端をNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転写開始配列(S)(EIS配列)のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列(E)、介在配列(I)及び転

写開始配列（S）と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側（センス鎖）合成DNA配列及びリバース側（アンチセンス鎖）合成DNA配列（プライマーセット）を作成する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために 5' 側に任意の 2 以上のヌクレオチド（好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない 4 塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3' 側にNotI 認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側にスペーサー配列として任意の 9 塩基または 9 に 6 の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3' 側に所望のcDNA の開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3' の末端とすることが好ましい。

リバース側合成DNA配列は5' 側から任意の 2 以上のヌクレオチド（好ましくはGC およびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない 4 塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3' 側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのE I S 塩基配列の合計が 6 の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール（rule of six）」； Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993）。さらに挿入断片の3' 側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTCACCCCT-3'（配列番号：1）、I配列の相補鎖配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTCTTACTACGG-3'（配列番号：2）、さらにその3' 側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成オリゴDNAの3' の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシークエンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにウイルスゲノムcDNA中のNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウイルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる（Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997）。例えば、まずNotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列（5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'）（配列番号：3）を、クローニングされたセンダイウイルスゲノムcDNA（pSeV(+)) のリーダー配列とN-タンパク質をコードする配列の5'末端との間の隣接遺伝子座に挿入し、デルタ肝炎ウイルスのアンチゲノム鎖（antigenomic strand）由来の自己開裂リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18^tb(+)を得る（Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820）。pSeV18^tb(+)のNotI部位に外来遺伝子断片を挿入し、所望の外来遺伝子が組み込まれた組み換えセンダイウイルスcDNAを得ることができる。

このベクターに、エピトープ結合 β 2mをコードするDNAを挿入する。本発明において用いるエピトープに制限はなく、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して治療効果を有する所望のエピトープ等を用いることができる。エピトープは、一般的には約10アミノ酸のペプチドを用いることが好ましいが、エピトープとするペプチドの長さは適宜変えることができる。エピトープ結合 β 2mは、例えば β 2mの分泌シグナルに続き、エピトープを連結させ、さらに適當な長さのスペーサー配列を介して β 2mに連結させた蛋白質とすることができる。ある

いは、スペーサーを介さず、エピトープを直接 β 2mと連結してもよい。スペーサーのアミノ酸配列に特に制限はないが、例えば Gly-Gly-Gly-Ser (配列番号：13) からなるアミノ酸配列またはその繰返しである (Gly-Gly-Gly-Ser)_n 等を含むペプチドを用いることが好ましい。繰返し回数 (n) に制限はないが、例えば 1 ~ 5 (1、2、3、4、または 5) にすることができる。スペーサーを用いる場合、その長さは好ましくは 16 アミノ酸以内であり、例えば 4 アミノ酸、8 アミノ酸、または 16 アミノ酸等を例示することができる。

このようにして作製した組み換えパラミクソウイルスベクターDNAに、適当な転写プロモーターを連結したDNAを構築し、これを試験管内または細胞内で転写させ、パラミクソウイルスのL、P、およびNPタンパク質の共存下でRNPを再構成させることにより、このRNPを含むウイルスベクターを生成させることができる。本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターのゲノムをコードするDNAを転写させる工程を含む、該ウイルスベクターの製造方法を提供する。また本発明は、該DNAからなる、本発明のパラミクソウイルスベクター製造用DNAを提供する。また本発明は、本発明のパラミクソウイルスベクターを製造するための、該ベクターのゲノムをコードするDNAの使用に関する。ウイルスベクターDNAからのウイルスの再構成は公知の方法に従って行うことができる (国際公開97/16539号；国際公開97/16538号；Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーペストウイルス、センダ

イウイルスなどを含む所望のパラミクソウイルスペクターおよびその他の(-)鎖RNAウイルスペクターをDNAから再構成させることができる。ウイルスペクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性のウイルス粒子を形成させることができある。

パラミクソウイルスペクターは、通常、(a) パラミクソウイルスに由来するネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖（ポジティブ鎖）をコードするベクターDNAを、NP、P、およびL蛋白質を発現する細胞（ヘルパー細胞）で転写させ、(b) 該細胞を培養し、その培養上清からウイルス粒子を回収することにより調製することができる。ベクターDNAから転写されたRNAは NP、L、およびPタンパク質とRNP複合体を形成し、さらにエンベロープ蛋白質を含む外殻に包まれたウイルス粒子が形成する。

ヘルパー細胞で発現させる、ウイルスゲノムをコードするDNA（ベクターDNA）は、ゲノムのマイナス鎖（ネガティブ鎖RNA）またはその相補鎖（ポジティブ鎖RNA）をコードしている。例えば、ネガティブ鎖一本鎖RNAまたはその相補鎖をコードするDNAをT7プロモーターの下流に連結させ、T7 RNA ポリメラーゼによりRNAに転写させる。プロモータとしては、T7ポリメラーゼの認識配列を含むもの以外にも所望のプロモーターを利用することができる。あるいは、インビトロで転写させたRNAをヘルパー細胞にトランスフェクトしてもよい。細胞内で転写させる鎖は、ウイルスゲノムのポジティブ鎖でもネガティブ鎖でもよいが、ポジティブ鎖が転写されるようにすることが再構成の効率を上げるために好ましい。

例えば、ベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的

の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞と共に沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、3 5°C、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30 μg/ml のとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10⁵) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界（電極間のギャップ、電圧）の強さ、パッファーの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられるが、これら

に制限されない。

cDNAからの再構成は具体的には次のようにして行うことができる。

24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ベニシリングおよび100 μg/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2を70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば1 μg/ml psoralen(ソラレン)存在下UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3(Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 μg、より好ましくは3~5 μgの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必要なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24-0.5 μgのpGEM-N、12-0.25 μgのpGEM-P、および24-0.5 μgのpGEM-L、より好ましくは例えば1 μgのpGEM-N、0.5 μgのpGEM-P、および1 μgのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect(QIAGEN社)を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 μg/mlのリファンピシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40 μg/mlのシトシンアラビノシド(AraC)(Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLC-MK2細胞にトランスフェクションして培養する。または、培養上清を回収し、LLC-MK2細胞の培養液に添加して感染させ培養する。培養3~7日後に培養液を回収する。あるいは、上記の凍結融解による細胞破碎物を10日齢の発育鶏卵の尿膜内へ接種し、約3日

後、尿液を回収してもよい。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドと共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエンベロープタンパク質を発現するLLC-MK2細胞に重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる（国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070参照）。培養上清または尿液に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」（Kato, A. et al., 1996, *Genes Cells* 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., *Hemaggulutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells.* Ed. by Baker AH. *Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine:* Humana Press: p. 295-306, 1999）により決定することができる。混入し得るT7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスを除去するために、得られた尿液試料を適宜希釈（例えば 10^6 倍）して、鶏卵で再増幅させることができる。再増幅は、例えば3回以上繰り返すことができる。得られたウイルスストックは-80°Cで保存することができる。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、LLCMK2細胞、サル腎由来のCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープタンパク質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに含む感染性ウイルス粒子を得ることもできる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったウイルスベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9

～12日間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組み換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのセンダイウイルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代眞人、「ウイルス実験プロトコール」，永井、石浜監修，メジカルビュー社，pp. 68-73, (1995)）。

例えば、F蛋白質を欠失したセンダイウイルスベクターの構築と調製は、以下のように行うことができる（国際公開番号 WO00/70055 および WO00/70070参照）。

<1> F欠失型センダイウイルスゲノムcDNAおよびF発現プラスミドの構築

センダイウイルス (SeV) 全長ゲノムcDNA、pSeV18⁺ b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)（「pSeV18⁺ b(+)」は「pSeV18⁺」ともいう）のcDNAをSphI/KpnIで消化してフラグメント(14673bp)を回収し、pUC18にクローニングしてプラスミドpUC18/KSとする。F欠損部位の構築はこのpUC18/KS上で行う。F遺伝子の欠損は、PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、結果としてF遺伝子のORF (ATG-TGA=1698bp) を除いて例えばatgcatagccggcagatga (配列番号：4) で連結し、F欠失型SeVゲノムcDNA (pSeV18⁺/ΔF) を構築する。PCRは、Fの上流には (forward: 5'-gtttagttactgcaagagc / 配列番号：5, reverse: 5'-tttgccggcatgcattttcccaaggggagattttttgcacc / 配列番号：6) 、F遺伝子の下流には (forward: 5'-atgcatagccggcagatga / 配列番号：7, reverse: 5'-tgggttaatgagagaatcagc / 配列番号：8) のPCR産物をEcoT22Iで連結する。このように得られたプラスミドをSacIとSalIで消化して、F欠損部位を含む領域の断片(4931bp)を回収してpUC18にクローニングし、pUC18/dFSSとする。このpUC18/dFSSをDraIIIで消化して、断片を回収してpSeV18⁺のF遺伝子を含む領域のDraIII断片と置き換え、ライゲーションしてプラスミドpSeV18⁺/ΔFを得る。

外来遺伝子は、例えばpUC18/dFSSのF欠失部位にある制限酵素 NsiI および NcoMIV 部位に挿入する。このためには、例えば外来遺伝子断片を、NsiI-tailed⁺

ライマーおよびNgoMIV-tailedプライマーで増幅すればよい。

〈2〉 SeV-F蛋白を誘導発現するヘルパー細胞の作製

センダイウイルスのF遺伝子（SeV-F）を発現するCre/loxP誘導型発現プラスミドの構築はSeV-F遺伝子をPCRで増幅し、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) のユニークサイトSwaI部位に増幅産物を挿入し、プラスミドpCALNdLw/Fを構築する。

F欠損ゲノムから感染ウイルス粒子を回収するため、SeV-F蛋白を発現するヘルパー細胞株を樹立する。細胞は、例えばSeVの増殖によく用いられているサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不動化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50 μg/mlを添加したMEMで37°C、5% CO₂で培養する。SeV-F遺伝子産物は細胞傷害性を有するため、Cre DNAリコンビナーゼによりF遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドpCALNdLw/Fを、リン酸カルシウム法(mammalian transfection kit (Stratagene))により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に10 μgのプラスミドpCALNdLw/Fをトランスフェクション後、10mlの10% FBSを含むMEM培地にて、37°Cの5%CO₂ インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、10ml培地に懸濁後、10cmシャーレ5枚を用い、5ml 1枚、2ml 2枚、0.2ml 2枚に蒔き、G418 (GIBCO-BRL) を1200 μg/mlを含む10mlの10%FBSを含むMEM培地にて培養を行い、2日毎に培地交換しながら、14日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。該培地により生育してきたG418に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

F蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた

後、アデノウイルスAxCANCreを齊藤らの方法 (Saito et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) により例えば moi=2または3で感染させて行う。

〈3〉 F欠失SeVウイルスの再構築及び增幅

上記 pSeV18⁺/ΔF の外来遺伝子が挿入されたプラスミドを以下のようにしてLLC-MK2細胞にトランスフェクションする。LLC-MK2 細胞を 5×10^6 cells/dish で 100mm ペトリ皿に蒔き、24時間培養後、ソラレンと長波長紫外線 (365nm) で 20 分間処理したT7 RNAポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) に室温で1時間感染させる (moi=2) (moi=2~3、好適にはmoi=2が用いられる)。ワクシニアウイルスへの紫外線照射には、例えば15ワットバルブを5本が装備されたUV Stratalinker 2400 (カタログ番号 400676 (100V), ストラタジーン社, La Jolla, CA, USA) を用いる。細胞を3回洗浄してからプラスミド pSeV18⁺/ΔF-GFP、pGEM/NP、pGEM/P、及びpGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579 (1996)) をそれぞれ 12 μg, 4 μg, 2 μg, 及び 4 μg /dish の量比でOptiMEM (GIBCO) に懸濁し、SuperFect transfection reagent (1 μg DNA/5 μl の SuperFect, QIAGEN) を入れて混合し、室温で10分間放置後、最終的に3% FBSを含むOptiMEM 3 mlに入れ、細胞に添加して培養する。3時間培養後、細胞を、血清を含まないMEMで2回洗浄し、シトシンβ-D-アラビノフラノシド 40 μg/ml (AraC, Sigma), トリプシン 7.5 μg/ml (GIBCO) を含むMEMで70時間培養する。これらの細胞を回収し、ペレットをOptiMEM に懸濁する (10^7 cells/ml)。凍結融解を3回繰り返してlipofection reagent DOPHER (Boehringer mannheim) と混合し (10^6 cells/25 μl DOPHER) 室温で15分放置した後、上記でクローニングしたF発現ヘルパー細胞の一つLLC-MK2/F7細胞にトランスフェクション (10^6 cells /well 12-well-plate) し、血清を含まないMEM (40 μg/ml AraC, 7.5 μg/ml トリプシンを含む) で培養し、上清を回収する。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウイルスゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる2種のベクターと同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低成本で生産することができる。これらのウイルスは、エンベロープ遺伝子が欠損しているため、エンベロープ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子をより安定に保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不穏化するため、環境放出管理上の利点がある。

なお、複製性のパラミクソウイルスベクターを個体や細胞に投与後、治療が完了するなどウイルスベクターの増殖を抑止する必要が生じた際には、RNA依存性RNAポリメラーゼ阻害剤を投与すれば、宿主に障害を与えずにウイルスベクターの増殖だけを特異的に抑止することもできる。

回収したパラミクソウイルスは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション（濾過）、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウイルスが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウイルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質（但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く）のうち、ウイルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウイルス

の具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法（特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報）、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法（W097/32010）等を例示することができる。

エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターは、哺乳動物細胞に導入することにより、該細胞でエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現・分泌させることができる。本発明は、エピトープ結合 $\beta 2m$ の生産方法であって、（a）エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および（b）該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、エピトープ結合 $\beta 2m$ を回収する工程、を含む方法を提供する。

また、哺乳動物細胞で発現したエピトープ結合 $\beta 2m$ は、細胞自身が持つか、あるいは外来的に発現されたMHC分子とヘテロダイマーを形成する。これを回収して、エピトープ結合 $\beta 2m$ を含む蛋白質複合体を得ることができる。特に本発明は、MHC class I 重鎖、およびエピトープ結合 $\beta 2m$ を含む、MHC class I/ペプチド複合体の生産方法であって、（a）エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、および（b）該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したMHC class I/ペプチド複合体を調製する場合、より好ましくは、哺乳動物細胞で外来的にMHC class I 重鎖を高発現させ、この重鎖とエピトープ結合 $\beta 2m$ の複合体を形成させる。例えばMHC class I 重鎖を発現するウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する。ウイルスベクターとしては、特に制限はないが、パラミクソウイルスベクターを好適に用いることができる。あるいは、他のベクターを用いててもよい。または、哺乳動物細胞の染色体にベクターを組み込み、恒常的または誘導的に所望のMHC class I 重鎖を発現するようにした細胞を用いることもできる。これにより、所望

のMHC class I 重鎖を細胞内で大量発現させ、MHC class I/ペプチド複合体を調製することが可能である。また、MHC class I/ペプチド複合体は、別々に調製したエピトープ結合 β 2mとMHC class I 重鎖とを結合させることにより調製することもできる。

発現させるMHC class I 重鎖としては膜結合型であってもよく分泌型（または遊離型）であってもよい。また、MHC class I 重鎖は、野生型蛋白質であってもよく、アミノ酸配列が改変された蛋白質であってもよい。分泌型 MHC class I 重鎖は、膜結合領域を欠失させた蛋白質を発現させることにより作製することができる。また、MHC class I 重鎖には所望のペプチドを付加することもできる。例えば、MHC class I 重鎖にビオチン化基質ペプチドを付加しておけば、これを発現させ、得られたMHC class I/ペプチド複合体をビオチン化した後で、アビシンを用いてMHC class I/ペプチド4量体を簡便に調製することが可能である。

本発明において「ビオチン化基質ペプチド」とはビオチン化の基質となり得るペプチドを言う。ビオチン化基質ペプチドとしては特に制限はなく、例えば-NH₂がアミノ酸残基として化学反応可能な状態で配列しているペプチドであればどのようなものも利用可能である。例えば反応試薬にAssay Designs 社のBiotin hydrazideを用いるならば糖部分に化学修飾可能であり、Biotin HNSを用いるならばリジンの-NH₂に化学修飾可能であり、Biotin BMCCを用いるならば-SHに化学修飾可能であり、5-(Biotinamido)-Pentylamine EZ-Linkを用いるならば-COOHに化学修飾可能である。好ましくは、ビオチン化基質ペプチドは酵素的にビオチン化され得るペプチドである。例えば、アミノ酸（例えばリジン）に特異的に1つのビオチンを付加する酵素（ビオチンライゲース）の基質となるペプチドが好適である。このような酵素としては、例えば Bir Aという大腸菌由来のビオチンライゲースが挙げられる。Bir Aは13アミノ酸からなるペプチド配列を認識し、その中央にあるリジンにビオチンを1つ付加することができる。Bir Aの基質となるペプチド配列は複数存在するが、例えば LGGIFEAMKMELRD（配列番号：31）などが挙げ

られる (Schatz, P. Biotechnology 11, 1138-1143 (1993); Crawford, F. Immun ity 8: 675-682 (1998))。

このようなMHC class I/ペプチド4量体を作製するには、(a) ピオチン化基質ペプチドを含むMHC class I 重鎖をピオチン化する工程、および(b) ピオチン化MHC class I 重鎖をアビジンの存在下で会合させる工程を含む方法により行なうことができる。具体的には、例えばMHC class I 重鎖にBir A 基質ペプチド(BSP) 配列を付加しておき、このMHC class I 重鎖を含むMHC class I/ペプチド複合体を調製する。その後、MHC class I 重鎖を Bir A 酵素によりピオチン化する。FPLC等により、ピオチン付加 MHC class I/ペプチド複合体を精製し、ストレプトアビジンのピオチン化部位と1:1になるように反応させることにより多量体化することができる。ストレプトアビジンは、適宜、R-フィコエリスリン (R-PE)、Cy 5等により標識することができる。4量体化したMHC class I/ペプチド複合体はCTL (エピトープ特異的CD8陽性T細胞)への結合能が高まるため、CTL (エピトープ特異的CD8陽性T細胞) の検出や定量に極めて有用である。MHC class I/ペプチド多量体が結合した細胞は、FACS等により検出することができる。

すなわち本発明は、本発明のベクターあるいは該ベクターを用いて発現させたエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を利用した抗原特異的Tリンパ球の検出および定量方法に関する。また本発明は本発明のベクター、あるいは該ベクターを用いて製造したエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を含む抗原特異的Tリンパ球の検出薬を提供する。また本発明は、本発明のベクター、あるいは該ベクターを用いて製造したエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体の、抗原特異的Tリンパ球の検出のための使用を提供する。

例えば、MHC class I/ペプチドテトラマーを用いれば、エピトープ特異的CD8陽性T細胞の定量を高感度かつ簡便に実施することができる。このテトラマーを用いた抗原特異的Tリンパ球の検出方法は、該テトラマーをTリンパ球を含む試料

中に存在させる工程、および、該テトラマーが結合した細胞を検出する工程、を含む方法である。該テトラマーが結合した細胞を定量することにより、抗原特異的Tリンパ球を定量することができる。

個体の中でのエピトープ特異的CD8陽性T細胞の定量は、例えばHIV由来のエピトープに対しては、HIV感染者のPBMC 1×10^6 に対して、HIVエピトープを提示するテトラマーをMHC class I/ペプチド複合体の量にして $20 \mu\text{g/ml}$ 添加し、 37°C で15分、 4°C で20分反応させる。このとき最適なテトラマーの量と反応温度は各テトラマーによって異なるので適宜調整する。その後抗CD8抗体-APCで重染色し、フローサイトメトリーを用いて解析すると、全CD8陽性T細胞中のテトラマー陽性細胞の頻度を得られる。PBMCに限らず、リンパ節など組織から分離した細胞でも同様に定量できる。

上記の要領でテトラマーで染色した細胞をさらに抗PE抗体-マグネットビーズ（第一化学薬品）にてさらに染色し、磁気細胞分離装置（第一化学薬品）を用いてエピトープ特異的細胞を分離することが可能である。このように、本発明のテトラマーはエピトープ特異的細胞の分離にも有用である。すなわち、本発明のテトラマーをTリンパ球を含む試料中に存在させる工程、および、該テトラマーが結合した細胞を分離する工程により、抗原特異的Tリンパ球を単離することができる。

また、本発明のベクターあるいは該ベクターを用いて発現させたエピトープ結合 $\beta 2m$ は、インピトロにおけるCTLアッセイに利用することもできる。CTLアッセイの標的細胞としては、通常CTLと同一個体由来の細胞株、例えばエプシュタイン-バールウイルス(EBV)を用いてtransformしたB細胞株(auto-lymphoblastoid cell line, auto-LCL)を合成ペプチドでパルスしたものが用いられるが、合成ペプチドの代わりに本発明のベクターにより製造したエピトープ結合 $\beta 2m$ を添加したり、あるいは合成ペプチドの代わりにエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができ、実際に細

胞傷害活性が確認された。またヒトの細胞株を使用する場合、目的のMHC class I重鎖（膜結合型）を発現するウイルスペクターとそのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスペクターを重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

また、エピトープ結合 $\beta 2m$ はエピトープ特異的細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の樹立に使用することができる。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にしHIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞（同一個体由来の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって可能となる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、本発明のエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスペクターを感染させた細胞の培養上清（すなわち遊離型エピトープ結合 $\beta 2m$ 蛋白質）でも同様の効果が見られた。また、stimulator細胞にエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスペクターを感染させることによっても同様にCTLを樹立できる。

さらに、本発明のエピトープ結合 $\beta 2m$ およびMHC class I/ペプチド複合体（1量体または多量体）を、例えばビオチン-アビシンの結合を利用する方法以外の方でプロテインチップの支持基材に結合し、プロテインチップとして用いることも可能である。

MHC class I 重鎖としては、特に制限はないが、ヒトへの適用のためにはヒトのMHC class I分子が好ましい。ヒトのMHC class I分子はヒト白血球抗原(human leukocyte antigen; HLA)と呼ばれ、非常に多様性に富んでいる。本発明において用いるHLAは、これらのいずれの分子でもよい。例えば感染症や癌などにおいて目的のエピトープが判明しているいずれのHLA型にも本発明を適用することが可能であり、オーダーメイド（あるいはテーラーメイド）な試薬とすることができます。

特に日本においては、HLA-A24(約6～7割)、HLA-A2(約4割)、及びHLA-A26(約2割)

)などのHLA型の頻度が高く、次いで、HLA-A11(2割)、-A31(2割弱)、-A33(2割弱)の頻度も高い。これらのHLAは、日本人への適用を考えた場合に特に好ましい。

ある程度の不特定多数に対応した試薬および医薬の開発のためには、例えば日本であれば、日本人において5%以上のアレル頻度のHLA（すなわち10%以上の日本人が有している）が好ましい。このようなHLA型としては以下のものが挙げられる。

A locus	B locus
A*0201	B*0702
A*0206	B*1501
A*1101	B*3501
A*2601	B*4001
A*31012	B*4002
A*3303	B*44031
	B*4601
	B*52011
	B*5401

実施例において本発明者らは、MHC class I分子としてA24拘束性HLA class I重鎖を用い、エピトープとしては、A24拘束性HLA class I分子によって提示されるHIV-1由来のエピトープを用いた。HLA-A*2402という遺伝子型は日本人の約6-7割が持つ。従って、A24拘束性HLA class I重鎖、特にA*2402 (Litte, A.-M., Immunogenetics 35: 41-45 (1992)) は、本発明において好適である。

本発明により得られるエピトープ結合β2mおよびMHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。本発明は、本発明により得られるエピトープ結合β2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤を提供する。また本発明は、本発明により得られるエピトープ結合β2mまたはMHC class I/ペプチド複合体の抗原特異的細

胞性免疫を誘導するための使用に関する。

本発明者らはSeVの発現系にてHLA-A*2402によって提示されるHIV-1 Nefタンパク由来のエピトープを例にエピトープ結合 β 2mを作製し、これが分泌型蛋白質の形で細胞表面上のHLA-A*2402分子と結合し、CTLに効率良く抗原を提示できることを証明した。本発明のウイルスペクターにより產生されるエピトープ結合 β 2mはタンパク製剤として利用できる可能性が示され、これを精製しウイルスの混入を除去すれば、臨床応用に有用な抗原特異的細胞性免疫誘導剤を得ることが可能である。本発明は、本発明のウイルスペクターにより產生されるエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を含む医薬組成物を提供する。

本発明のエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を用いて抗原特異的細胞性免疫を誘導する方法は、具体的には、本発明のエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を（エピトープ特異的）CD8陽性T細胞に接触させる工程を含む方法である。

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、本発明のエピトープ結合 β 2mは有用である。エピトープ特異的CTLは、試験管内で1回～数回特異的な刺激を加えることによって樹立できる。例えばHIV Nef138-10特異的CTLを樹立する場合、HIV-1感染者の末梢血単核球(PBMC)を、放射線照射によって増殖不能にし、HIV Nef138-10ペプチドでパルスしたstimulator細胞（同一個体由來の細胞）で刺激を加え、IL-2存在下で共培養することによって可能となる。この時、通常合成ペプチドを使用するが、エピトープ結合 β 2m感染細胞培養上清等でも同様の効果が得られる。

また、本発明のエピトープ結合 β 2mは、インビトロでのCTLアッセイの標的細胞のパルスに有用である。CTLアッセイの標的細胞をパルスする際、合成ペプチドの代わりにエピトープ結合 β 2m感染細胞培養上清等でも同様の効果が得られる。通常は細胞表面上に、MHC class I重鎖（膜結合型）+ β 2m+ペプチドが既に発現している。ペプチドのパルスは、ペプチド部分の入れ替えを狙ったやり方であるが、

エピトープ結合 β 2mでは、 β 2m+ペプチドとの入れ替えが行われるものと考えられる。

また、エクスピボで患者樹状細胞へパルスする際にも本発明のエピトープ結合 β 2mは有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この樹状細胞にエピトープ結合 β 2mをパルスし、患者の皮下に接種する。インビボの項と同様、細胞表面でMHC class I重鎖（膜結合型）+エピトープ結合 β 2mの形で発現し、エピトープ特異的CTLを誘導できることが期待される。樹状細胞をペプチドでパルスした場合より、エピトープがMHC class I重鎖（膜結合型）上に長く発現する可能性があり、細胞性ワクチン（治療ワクチン）として期待できる。また、本発明のエピトープ結合 β 2mをインビボでタンパク製剤として直接投与することにより、エピトープ特異的CTLを誘導することも可能と考えられる。

また、エピトープ結合 β 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター自身を、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために使用することができる。本発明は、エピトープ結合 β 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを含む抗原特異的細胞性免疫の誘導剤に関する。また本発明は、エピトープ結合 β 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターの、抗原特異的細胞性免疫を誘導するための使用に関する。本発明のウイルスベクターは、遺伝子治療のために有用である。本発明は、エピトープ結合 β 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターを含む医薬組成物を提供する。該ウイルスベクターは、抗原特異的細胞性免疫を誘導できるため、感染症や癌などにおいて抗原特異的免疫を誘導するために有用である。本発明のウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接（インビボ）投与による遺伝子発現、間接（エクスピボ）投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても投与することができる。

例えば、インビトロでのエピトープ特異的CTL細胞株の樹立において、stimulat

or細胞での刺激において合成ペプチドを使用する代わりにエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターを感染させることによってCTLを樹立できる。

また、インビトロでCTLアッセイの標的細胞のパルスにおいて本発明のベクターを使用することもできる。合成ペプチドの代わりにエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターをauto-LCLに感染させることによって標的細胞として使用することができ、実際に細胞傷害活性が確認された。またヒトの細胞株を使用する場合、目的のMHC class I重鎖（膜結合型）を発現するウイルスベクターとそのMHC class I重鎖によって提示されるエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現するウイルスベクターを重感染させることによって同様に標的細胞として使用することができる。

さらに本発明のベクターは、エクスピボで患者樹状細胞への遺伝子導入にも有用である。患者の末梢血単核球を採取し、スタンダードな方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この樹状細胞にエピトープ結合 $\beta 2m$ 発現ウイルスベクターを感染させ患者の皮下に接種する。ペプチドやエピトープ結合 $\beta 2m$ 蛋白などでパルスしても、樹状細胞上でどれくらいの期間持続発現されるかが問題かも知れない。実際にペプチドパルスでは、樹状細胞上でのエピトープは発現が短期間で消失することが指摘されている。その点ウイルスベクターで感染させ、細胞内からエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現させれば、長期にわたってエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現させることができる。さらに、インビボでのベクター投与によりエピトープ特異的CTLを誘導するインビボ遺伝子治療にも本発明のベクターは有用である。

ベクターによる遺伝子導入の標的となる細胞は、好ましくは抗原提示能を有する細胞である。このような細胞としては、特に樹状細胞（DC）が挙げられる。例えば、エクスピボにおいて、樹状細胞に本発明のベクターを導入することによって、該細胞において所望のMHC class I/ペプチド複合体を形成させることができ。この細胞を用いて、抗原特異的T細胞を活性化することができる。本発明は、本発明のエピトープ結合 $\beta 2m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞に関する。哺乳動物細胞としては、抗原提

示能を有する所望の単離細胞等を用いることができる。特に、該細胞においてMHC class I 重鎖をコードする遺伝子を外的に導入することにより、大量のMHC class I/ペプチド複合体を形成させることができる。MHC class I 重鎖をコードする遺伝子は染色体外に存在する発現ベクターにコードされていてもよく、また細胞の染色体に組み込まれていてもよい。細胞内で分泌型MHC class I 重鎖を発現させれば、細胞から分泌型のMHC class I/ペプチド複合体が産生される。この細胞は、特に分泌型のMHC class I/ペプチド複合体の調製に有用である。細胞で膜結合型MHC class I重鎖を発現させれば、該細胞表面に膜結合型MHC class I/ペプチド複合体が発現する。この細胞は、エピトープ特異的CTLに対して優れた抗原提示能を有する。また本発明は、本発明の方法により製造したエピトープ結合 β 2mを細胞表面に有する細胞に関する。このような細胞は、例えば、本発明の方法により製造したエピトープ結合 β 2mを細胞に添加することにより調製することができる。例えば、患者から樹状細胞を調製し、試験管内で当業者に公知の方法で樹状細胞へと分化を誘導する。この細胞を本発明の方法により製造したエピトープ結合 β 2mと混合する。これにより、このエピトープ結合 β 2mが、患者由来の樹状細胞表面のMHC class I重鎖と複合体を形成する。この細胞も、エピトープ特異的CTLに対して抗原提示を行う能力を有する。このようにして作製した、目的のエピトープを提示する細胞を患者体内に戻すことにより、このエピトープに特異的な免疫を誘導することができる。すなわちこの細胞はワクチンとして利用することができる。このように、本発明の方法により製造されたエピトープ結合 β 2mは、患者において抗原特異的免疫を誘導するための医薬として有用である。本発明の方法により製造したエピトープ結合 β 2mを細胞にパルスすることにより、エピトープ結合 β 2mを細胞表面に有する細胞を調製する場合においては、パルスする前に酸処理により既存のエピトープを除去することができる。酸処理とは、細胞表面に提示されているエピトープペプチドが有意に解離するような酸性環境に細胞を暴露する工程により実施することができる。酸処理は、例えば細胞を 4°C の pH

ptide stripping buffer (0.13M citric acid (pH3), 66mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 17mg/ml Phenol Red) で1分間処理し、その後十分量の培養液（例えばRPMI）にて中和することにより実施することができる。当業者であれば、これ以外にも同様の効果を示す酸処理を異なるプロトコルで行うことができる。本発明は、上記のエピトープ結合 β 2mを発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクターが導入された細胞、または本発明の方法により製造されたエピトープ結合 β 2mを持つ細胞を含む医薬組成物を提供する。

基本的に、体細胞のほとんどはMHC class Iを内因的に発現しているため、上記の細胞の製造においてはMHC class I重鎖を外来的に発現させる必要はなく、エピトープ結合 β 2mのみを発現または添加すればよい。患者のMHC型を検査し、この型に沿って選択したエピトープ結合 β 2mを発現または添加することにより、テラーメイドの治療を実現することができる。例えば、患者のMHC class IのタイプがA24拘束性であるなら、A24拘束性T細胞により提示されたエピトープを融合させた β 2mを用いることにより、より有効な治療効果を得ることができると期待される。MHC型は血清型または遺伝型で一致していることが好ましく、遺伝型で一致していることがより好ましい。HLA-A*2402という遺伝子型は日本人の約7割が持つため、この型を持つ細胞により提示されたエピトープを同定し、これを用いてエピトープ結合 β 2mを設計することにより、特に日本人への適用に適した医薬を作り出すことが可能である。さらに様々なMHC型のエピトープを解析することにより、個々の患者に最適な治療戦略を決定することが可能となる。

本発明の哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター、該ベクターにより得られるエピトープ結合 β 2mおよびMHC class I/ペプチド複合体、該ベクターが導入された細胞、または該エピトープ結合 β 2mを細胞表面に有する細胞は、必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせて組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは本発明のベクター、エピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体、あるいは上記細胞と共に投与す

ることが可能であり、これらの活性を有意に阻害しない材料である。例えば本発明の哺乳動物細胞感染性ウイルスペクター、あるいは該ベクターにより得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体を生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水（PBS）などで適宜希釈して組成物とすることができます。パラミクソウイルスペクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでよい。また上記細胞は生理食塩水、PBS、または培養液などに懸濁してもよい。また本発明の組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明の組成物は試薬として、および医薬として有用である。また本発明の組成物はワクチンとして有用である。本発明は、本発明のベクターあるいは該ベクターにより得られるエピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体、あるいは上記細胞を含む組成物の試薬、医薬、またはワクチンとしての使用にも関する。ワクチン組成物は、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。またワクチンには、ミョウバン、不完全Freund'sアジュバント、MF59（オイルエマルジョン）、MT P-PE（マイコバクテリア細胞壁由来の muramyl tripeptide）、およびQS-21（soap bark tree *Quillaja saponaria* 由来）などのアジュバントを組み合わせることもできる。

また、本発明の医薬組成物の投与に際しては、アジュバント効果を高めるサイトカイン類を組み合わせることも有効である。このような遺伝子としては、例えば i) IL-2と一本鎖IL-12との組み合わせ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (15) : 8591-8596, 1999）、ii) IL-2とインターフェロン- γ （米国特許第 5,798,100 号）、iii) 単独で用いられる顆粒球コロニー刺激因子（GM-CSF）、iv) 脳腫瘍を治療対象とした GM-CSF と IL-4 の組み合わせ（J. Neurosurgery 90 (6), 1115-1124 (1999)）などが挙げられる。

ワクチンとして用いる場合、例えば腫瘍、感染症、およびその他の一般的な疾患に対して適用することができる。感染症の治療としては、例えば感染性微生物の抗原蛋白のエピトープを解析し、これを結合させた β 2mを製造することができる。抗原蛋白としては、例えばインフルエンザにおいては、強毒株H5N1型等のエンベロープ、日本脳炎においては、例えばエンベロープ蛋白質 (Vaccine, vol. 17, No. 15-16, 1869-1882 (1999))、エイズにおいては、例えばHIV gagまたはSIV gag 蛋白質 (J. Immunology (2000) vol. 164, 4968-4978)、HIVエンベロープ蛋白質、Nef蛋白質、その他のウイルス蛋白質などが挙げられる。コレラにおいては、例えばコレラ毒素のBサブユニット (CTB) (Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(10): 934-8、Arakawa T, et al., Nature Biotechnology (1998) 16(3): 292-7)、狂犬病においては、例えば狂犬病ウイルスの糖タンパク (Lodmell DL et al., 1998, Nature Medicine 4(8):949-52)、子宮頸癌においては、ヒトパピローマウイルス6型のカプシドタンパクL1 (J. Med. Virol, 60, 200-204 (2000)) などが挙げられる。また、病原性のバラミクソウイルス、例えば、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルスのようなワクチンの必要性の高いウイルスに本発明を適用することもできる。また、日本脳炎のJE-E抗原タンパク質（特開昭64-74982、特開平1-285498）。ヒト単純ヘルペスウイルスの gD2タンパク質（特開平5-252965）。C型肝炎ウイルス由来ポリペプチド（特開平5-192160）。偽狂犬病ウイルス由来ポリペプチド（特表平7-502173）などにおけるエピトープを用いることもできる。例えば、これらの病原性微生物に感染した患者由來の細胞を解析して、抗原提示細胞 (APC) において提示された抗原蛋白のエピトープを同定する。HLA型を適宜選択することにより、所望のHLA型に対するエピトープを同定することが可能である。

腫瘍特異的抗原に着目し、それらを標的とした多角的な新しい治療戦略や治療法の開発を行うことには腫瘍治療の上で臨床的意義がある。例えば腫瘍治療としては、腫瘍細胞、またはDC細胞などの抗原提示細胞 (APC) に本発明のベクターを

用いてエピトープ結合 β 2mを発現させたり、エピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体等の蛋白質製剤を投与することができる。

一般的な手法としては、ヘルパーT細胞（Th）への抗原提示能を持つことが知られている樹状細胞（DC）が、CTLに対してもMHCクラスI分子を介して高い抗原提示能を有することが知られており、これを用いたワクチン療法の開発が挙げられる

(J. I. Mayordomo et al., Nature Med. 1(12), 1279-1302, (1995))。腫瘍免疫療法の一例としては、種々の悪性腫瘍にも発現が認められるMAGE抗原を標的とした腫瘍ワクチン療法の確立が藤也寸志ら（国立病院九州がんセンター）により進められている。再発胃腫瘍症例6例、再発食道腫瘍1例の7例に対し治療を施行したところ、食道腫瘍症例で転移リンパ節の縮小、腫瘍マーカーの減少および臨床症状(嘔声)の改善が認められ、胃腫瘍症例では6例中4例で腫瘍マーカーの減少を認めている。副作用は全く認められておらず、腫瘍免疫療法の安全性が示唆されている。また臨床症状の改善や腫瘍マーカーの低下が見られた症例が多く、ワクチンの投与法や適応症例の選別などにより有効な治療法となりうる可能性を示唆している。MAGE-3ペプチドを用いたDCワクチン療法は、実際に臨床試験が開始され、進行再発消化器癌症例に対する安全な腫瘍特異的免疫療法となる可能性が示唆される。しかしながら多数の患者を対象とした予防的ワクチン投与においては、"nature adjuvant" である樹状細胞を各々の患者に対して最適に調整、投与していくのは明らかに頻繁で、非現実的である。何らかの効率的方法が求められている（『山岸 久一ら京都府立医科大学 日本癌治療学会総会1999年10月12日（火）於 岐阜市での発表』）。このような腫瘍ワクチン療法に本発明を適用することは極めて有効であると考えられる。

ウイルスが引き金となってできる腫瘍の予防は、そのウイルスのワクチンによる感染予防により達成されうる。ウイルスが原因の腫瘍は他の原因による腫瘍に比較し、確実に予防が可能となる。例えば、肝臓腫瘍に関わるC型肝炎(HCV)、子宮がんに関わるパピローマウイルス(HPV)、成人性白血病の原因であるHTLV-1につ

き、感染予防と治療を目的としたワクチンがあげられる。肝臓腫瘍は日本の腫瘍発症の中でも高い割合を占める。C型肝炎ウイルスは非経口的に感染し、免疫能が正常の成人であっても高率に慢性化する。感染者の約20%は慢性肝炎、肝硬変を発症するものと考えられる。更に、肝硬変患者の多くで肝細胞癌が発症する。C型肝炎に対する治療はインターフェロンの登場により患者の一部で治癒に導くことが可能となつたが、有効率は当初期待されたほどではなく、半数以上の患者に対して、いまだに有効な治療法がない現状である。一般のウイルス感染の予防は、ワクチン接種により中和抗体を誘導して行うがC型肝炎ウイルスは変異しやすく、現在の所、感染を終息させる中和抗体の存在は証明されていない。ウイルス感染症では中和抗体の誘導以外にCTLを誘導することにより、感染予防が可能であることが知られている。本発明のベクターの投与により、このようなケースに対してもCTL活性化を誘導できると期待される。

森山貴志(自治医科大学)らは、CTLを誘導する新しい方法として病原体抗原をコードする遺伝子そのものをワクチンとして用いる方法(DNAワクチン)を研究している。その問題点は概説書が示すとおり、発現量が十分でない、投与部位が筋肉などに限られる等がある(『DNAワクチン その現状と新知見; 倉根一郎(感染症研); 今日の感染症; Vol. 19, NO. 3 PAGE. 6-9, 2000』)。また『癌と免疫 癌の特異的免疫療法 HER2由来ペプチドによる乳癌のワクチン療法; 影山慎一, 渡辺正人, 日浅厚則, 珠玖洋(三重大 医); 現代医療; Vol. 32, NO. 5 PAGE. 1167-1172 2000』では乳癌などで過剰発現が認められているチロシンキナーゼ活性を持つ膜型糖蛋白質HER2を利用した癌ワクチンについて概説されている。本発明により適用されるウイルスペクターは、このようなDNAワクチンよりも高い効果を発揮することが期待される。哺乳動物の広範な組織で発現可能なウイルスペクター(アデノウイルスペクター、アデノ随伴ウイルスペクター、単純ヘルペスウイルスペクター、レトロウイルスペクター、レンチウイルスペクター、セムリキ森林ウイルスペクター、シンドビスウイルスペクター、ワクシニアウイルスペクター、セン

ダイウイルスベクターなど)を用いて本発明のベクターを構築すれば、高い効率を有するワクチンを提供することが可能と考えられる。

子宮がんは女性のみの腫瘍であるが、HPVによる感染予防と治療ワクチンの開発の重要性は変わらない。HTLV-1は、母子感染が主な感染ルートと理解されるに至ったが、それ以外の感染経路もある。近年発見されたHGVは病原性は明確になっていないが、HCVと共に社会に拡がっており、このようなウイルスの防疫も公衆衛生上必要であり、本発明の適用の対象となる。

抗原提示細胞の利用並びに投与経路に関する検討も重要である。最も研究されている投与経路は、樹状細胞 (DC) がCTLに対してもMHC class I分子を介する抗原提示能を有することを利用して、末梢血のわずかなDCを患者から取り出し試験管内で培養増幅して、これを静脈内注射で体内にもどす方法を用いたワクチン療法である。この方法は相当の施設と、培養時間を必要とする方法である。最近注目される方法は皮膚を利用したワクチン療法である。ランゲルハンス細胞 (LC) を含む樹状細胞は、近年その細胞上のMHC class I分子を介してウイルス抗原や癌抗原などの内在性の抗原を効率的にCTLに提示することが判明し、この細胞を用いた抗ウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法の研究が大きく注目されている。皮膚の表皮には多数のLCが常在しているので、皮膚へのウイルスペプチドまたは癌ペプチド、さらには抗原含有遺伝子の塗布により効果的なDNAワクチン法が開発できる可能性がある。しかしながら正常皮膚でLCは休止状態にありThやCTLへの抗原提示能は低く、リンパ節内への移動性にも富まないので正常皮膚を用いてのウイルスワクチン法や癌ワクチン治療法は実現が難しい。これを解決する方法として、瀬尾尚弘、瀧川雅浩(浜松医科大学)らは皮膚最外層の角質層バリアをテープストリッピング(TS)を8~15回繰り返すことによって破壊し、その皮膚でLCが活性化し、リンパ節内へ移動し効率的にTh細胞に抗原提示することを実証した(特願平10-316585 Percutaneouspeptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin foreperimental tumor immunoprophylaxis; Proc. Natl. Acad. Sci. U

. S. A. Vol. 97, Issue 1, 371-376, January 4, 2000)。このような方法はバリア破壊皮膚へのウイルスペプチド、癌ペプチドさらには抗原DNAの適用においてウイルスワクチンまたは癌治療の可能を広げるものである。本発明においても、これらの投与方法を適用することができる。

さらに確実な臨床応用のためには、ヒトHLA拘束性癌特異的CTL株を作製し、その認識する癌反応性CTL誘導抗原遺伝子をクローニングし、癌患者に対して臨床応用可能な腫瘍特異的免疫療法の標的分子を開発することが重要である。対象とする患者と同じ型を持つHLAにより提示されたエピトープを同定し、これを用いて本発明のベクターやペプチドワクチンを製造することにより、より効果的に免疫を誘導することができる。

日本において多発する癌、例えば肺癌、消化管癌(食道、胃、大腸癌)、肝癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌、卵巣癌、腎癌及び白血病のなかでも、組織型としてはそれらの大部分を占める扁平上皮癌及び腺癌を治療ターゲットする事は臨床上有益である。上皮性癌は日本における成人悪性腫瘍の大半を占めるのみならず、世界にも最も頻発する癌である。よって、上皮性癌細胞特異的抗原のエピトープは、本発明において好適に用いられる。またHLAとしては日本でも発現頻度の高いHLA-A24(癌患者の約6割)、HLA-A2(約4割)、及びHLA-A26(約2割)抗原拘束性のCTL認識性癌退縮抗原の同定が特に重要である。次いで、HLA-A11(2割)、-A31(2割弱)、-A33(2割弱)を対象とする同定も重要である。日本人の95%以上は少なくともHLA-A24、-A2、-A26、-A31、-A33のいずれか一方を保有する。また上記HLAアレールは人種をこえて広く認められる。したがってこれらのタイプのHLAを持つ細胞から癌反応性CTL誘導抗原遺伝子を同定し、これを本発明に適用することが好ましい。

伊東恭悟(久留米大 医)らは日本人に多発するヒトHLA-クラス・拘束性上皮癌(腺癌及び扁平上皮癌)に対する特異的キラーT細胞を多数樹立し、それらの認識する上皮癌反応性CTL誘導能をもつ抗原遺伝子をすでにクローニングしている。さらに同遺伝子によりコードされる癌抗原ペプチドを同定し、同ペプチドによるイ

ンピトロにおけるキラーT細胞誘導能の解析が行われている（食道癌患者自己CTL癌局注による特異的養子免疫療法後の末梢血リンパ球に対するクローニングとその解析：唐宇飛，山名秀明，末吉晋，新谷文彦，田中寿明，久保田雅博，峯孝志，笠原弘子，伊東恭悟（久留米大）；日本消化器外科学会雑誌；Vol. 33, No. 7, Page 1191, 2000）。これまでのところ扁平上皮癌cDNAライブラリーより4種類の遺伝子(SART-1～SART-4)、腺癌cDNAライブラリーより3種類の遺伝子がクローニングされ、それらをコードする蛋白が解析されている。SART-1遺伝子導入した癌細胞は選択的アポトーシスを誘導した。またHLA-A24拘束性ペプチド(SART-1 690-698)が強いCTL誘導およびHLA-A26拘束性ペプチドSART-1 736-744によるHLA-A2601-A2602、-A2603癌患者CTL誘導が確認されている（『腫ようの抗原ペプチド療法 SART-1抗原ペプチドを用いた癌ワクチン療法；山名秀明，伊東恭悟（久留米大医）；医学のあゆみ；Vol. 190, NO. 2 PAGE. 129 - 133 1999』、『SART1ペプチドによるサブタイプの異なるHLA-A26陽性健康人及び癌患者末梢血リンパ球からのCTLの誘導；井上佳子（国立腫瘍セ研）；中尾真修，松永和子，増岡・菊地慈，山名秀明，伊東恭悟（久留米大医）；日本癌学会総会記事』）。さらにSART-3癌反応性CTL誘導抗原遺伝子：140 kDのSART-3抗原が増殖細胞に選択的に発現し、かつ癌細胞に限って核内にも発現し、同抗原内にHLA-A24+癌患者リンパ球よりCTL誘導能を有する2つの9個のアミノ酸からなるペプチド（nonapeptide）が同定されている（『転移性癌患者におけるHLA-A24拘束性lck由来ペプチドを用いた細胞傷害性T細胞の誘導と機能解析；山名秀明，笠富輝男，宮城佳昭，唐宇飛，白水和雄，伊東恭悟（久留米大医）；日本外科学会雑誌；Vol. 101, 臨時増刊号 PAGE. 417 2000』）。これらの癌反応性CTL誘導抗原の各種癌における蛋白レベルでの発現はSART-1抗原は扁平上皮癌の60～80%、乳癌を除く腺癌の40～50%に発現していた。またSART-2は扁平上皮癌の60%以上に、SART-3は腺癌、扁平上皮癌を含む大部分の悪性腫瘍で発現していた。これに対し、これらの抗原は正常組織には睾丸を除き発現されていない（腫よう免疫 9 ヒト癌特異的キラーT細胞により認識され

る抗原 2ヘン平上皮癌反応性CTL誘導抗原SART-1およびペプチドワクチン；伊東恭悟，七条茂樹，山名秀明（久留米大 医）；免疫 Immunology Frontier；Vol. 9, No. 3, Page 195-204, 1999）。HLA-A26は日本人の22%、HLA-A*2402は日本人の約60%が保有している。これらより、日本における多くの上皮性癌患者に対してこれらのペプチドワクチンは応用可能と考えられている。現在久留米大学において上記ペプチドを用いての第1相臨床試験が計画されている（臨床ガイドライン解説 第1回腫瘍ペプチドワクチン臨床試験のガイドラインについての提案；山名秀明，伊東恭悟（久留米大 医）；分子細胞治療； Vol. 1, No. 1, Page 89-95, 2000）。これらの抗原蛋白質に由来するエピトープに本発明を適用することは有効であると考えられる。

以上に記載したペプチド抗原をコートする遺伝子を本発明に用いれば、腫瘍に対する有効な免疫治療を行うことが可能となる。その他のエピトープとしては、癌抗原 Muc-1 または Muc-1様ムチンタンデムリピートペプチド（米国特許第 5,744,144号）、メラノーマ gp100抗原などが挙げられる。これらの遺伝子による治療は、乳癌、結腸癌、膵臓癌、前立腺癌、肺癌等、幅広い応用が示されている。また、上記に示した腫瘍抗原ペプチドHER2遺伝子の正常組織および腫瘍での発現は、乳癌、卵巣癌、胃癌、非小細胞性肺癌において約20から40%の症例に遺伝子増幅または発現の増加が認められ、その発現増加は腫瘍特異性の傾向が高いと考えてよい。卵巣癌患者および健常人末梢血由来単核球より精製した樹状細胞とHER2由来の2種の9merペプチド（HER2p63-71、 p780-788）なども例示することができる（Eur. J. Immunol. 2000; 30: 3338-3346）。また、CEA陽性進行固形癌に対して、CEAエピトープペプチドを用いた癌ワクチン療法（特異能動免疫療法）に本発明のベクターまたは蛋白質を適用することも考えられる（Kim, C. et al., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 90-96）。例えば、成分採血により患者より多量の末梢血単核細胞を採取した後、その単球分画からIL-4、GM-CSF添加下に樹状細胞(DC)を誘導、誘導されたDCに本発明のベクターを用いて製造したCEAペプ

チドあるいはベクターそのものを導入し、"DCワクチン"として皮内投与することが考えられる (CEA特異的能動免疫療法により血清CEA値と抗腫よう効果に解離を認めた肺癌 骨転移の一例； 清水啓二，上田祐二，伊藤剛，岡本和真，白数積雄，阪倉長平，大辻英吾，北村和也，山岸久一(京都府医大)； 日本臨床外科学会雑誌)。

また、一般病への適用も考えられる。糖尿病においては、例えばI型糖尿病モデル動物において、インシュリン断片のペプチドをエピトープとして利用することが考えられる (Coon, B. et al., J. Clin. Invest., 1999, 104(2):189-94)。

本発明のベクターまたは本発明のベクターにより得られるエピトープ結合 β 2mまたはMHC class I/ペプチド複合体を含む組成物は、抗原特異的細胞性免疫を少なくとも部分的に誘導するのに十分な量を投与される。但し、投与蛋白質量、または導入遺伝子の発現量は、その有効レベルおよび中毒レベルを考慮して決められるべきである。投与経路は適宜選択することができるが、例えば経皮的、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、腹腔内、静脈内、関節内、または皮下等に行われるがそれらに限定されない。また局所あるいは全身に投与し得る。細胞性免疫の誘導は、本発明に記載したようなCTLアッセイ等により検出することができる。

本発明のベクターの投与により細胞に導入された遺伝子の発現量は、当業者に公知の方法によりアッセイすることが可能である。遺伝子の転写産物は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、RNAプロテクションアッセイ等により検出・定量することができる。ノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCR等による検出は *in situ* でも行い得る。また、翻訳産物を検出するには、抗体を用いたウェスタンプロット、免疫沈降、RIA、ELISA、プルダウンアッセイ等により行うことができる。また、導入遺伝子発現の検出を容易にするため、発現させる蛋白質にタグを付加したり、レポーター遺伝子を発現するように組み込んでおくことも可能である。レポーター遺伝子は、 β ガラクトシダーゼ、CAT、アルカリホスファターゼ、またはGFPをコードする遺伝子等が挙げられるがこれらに制限されな

い。

エピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体の投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。例えば、10ng/kgから100 $\mu g/kg$ 、好ましくは100ng/kgから50 $\mu g/kg$ 、より好ましくは1 $\mu g/kg$ から5 $\mu g/kg$ の範囲であるとよい。複数のエピトープを組み合わせて投与する場合には、それぞれを上記の量で投与するとよい。エピトープ結合 $\beta 2m$ またはMHC class I/ペプチド複合体は、適宜、薬学上容認可能な担体と組み合わせて投与することができる。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。パラミクソウイルスベクターであれば、投与されるベクターの力価は好ましくは約10⁵ pfu/mlから約10¹¹ pfu/ml、より好ましくは約10⁷ pfu/mlから約10⁹ pfu/ml、最も好ましくは約1×10⁸ pfu/mlから約5×10⁸ pfu/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。投与量は、好ましくは約10⁵ pfu/回から10¹¹ pfu/回、より好ましくは約10⁷ pfu/回から10⁹ pfu/回、最も好ましくは約10⁸ pfu/回から10⁹ pfu/回で投与する。

本発明のウイルス含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

図面の簡単な説明

図1は、エピトープ結合 $\beta 2m$ (e/ $\beta 2m$) を発現するSeVベクター (e/ $\beta 2m$ /SeVb) の構造を示す図である。

図2は、膜結合型および分泌型HLA A*2402を発現するSeVベクターの構造を示す図である。分泌型分子には、ビオチン化基質ペプチド (Bir A基質ペプチド) が付加されている。

図3は、膜結合型HLA A*2402を発現するSeVベクターの構造を示す図である。

図4は、エピトープ結合 β 2m発現SeVベクターおよび分泌型HLA A*2402発現SeVベクターを重感染させた細胞から回収されたMHC class I/ペプチド複合体の検出を示す図である。A24-BSP*his*/SeVbおよびe/ β 2m/SeVbを、それぞれm. o. i.=10および2でCV-1細胞に重感染した。3日後に、培養上清100 μ lを回収し、MHC class I/ペプチド複合体をELISAで検出した。陰性コントロールとしてe/ β 2m/SeVbの代わりに β 2m/SeVbあるいはwt/SeV（外来遺伝子を持たない野生型SeV）を感染したもの用いた。

図5は、分泌型MHC class I/ペプチド複合体の精製を示す図および写真である。A24-BSP*his*/SeVbおよびe/ β 2m/SeVbを、それぞれm. o. i.=10および2でCV-1細胞に重感染した。3日後に、培養上清100mlを回収し、抗Hisタグ抗体を用いたFPLCで分画した。各フラクションの一部をSDS-PAGEおよびウェスタンプロットにより確認し蛋白質を定量した。約1mgの分泌型MHC class I/ペプチド複合体を回収した。

図6は、膜発現型MHC class I/ペプチド複合体の効果を示す図である。H9細胞（ヒトT細胞株、HLA-A*2402-）にA24full/SeVbおよびe/Nef138- β 2m/SeVbをそれぞれm. o. i.=10および2で感染した。陰性コントロールとしてe/Nef138- β 2m/SeVbの代わりにwt/SeVを感染したものを用いた。18時間後100 μ CiのNa₂⁵¹CrO₄で2時間ラベルしNef138-10特異的CTLクローニングを用いて⁵¹Cr放出アッセイを行った。

図7は、分泌型エピトープ結合 β 2mの効果を示す図である。H9細胞（HLA-A*2402- ヒトT細胞株）にe/Nef138- β 2m/SeVbまたは対照群としてwt/SeVをm. o. i.=2で重感染させ、3日後に培養上清を回収し0.22 μ mのフィルターを用いて濾過した。

標的細胞としてH9細胞（HLA-A*2402- ヒトT細胞株）にA24full/SeVbおよびwt/SeVをそれぞれm. o. i.=10および2で重感染した。SeV感染後、18時間経過した標的細胞を100 μ CiのNa₂⁵¹CrO₄で2時間ラベルした。その後、上記のように調製したe/Nef138- β 2mを含む培養上清、もしくは陽性コントロールとして10 μ M Nef138-10合成ペプチド、陰性コントロールとしてwt/SeV感染細胞培養上清をパルスした。1

時間後、Nef138-10特異的CTLクローニングを用いて⁵¹Cr放出アッセイを行った。比較としてA24full/SeVbおよびe/Nef138-β2m/SeVbをそれぞれm. o. i.=10および2で重感染したH9細胞も同様にアッセイした。

図8は、MHC class I/ペプチド4量体によるエピトープ特異的CD8陽性T細胞の検出を示す写真である。HLA-A*2402を持つHIV感染者および健常人の末梢血単核球(PBMC)1×10⁶に20 μg/mlのMHC class I/ペプチド4量体であるA24/Nef138-10テトラマー-RPE標識を加え、37°Cで15分反応させた。1回洗浄した後、抗CD8抗体-APC標識を加え4°Cで20分反応させた。その後3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS(Phosphate-Buffered Saline)にて固定した。染色および洗浄には2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いた。図はリンパ球分画1×10⁵をA24/Nef138-10テトラマーと抗CD8抗体で展開したもので、図中の数字はCD8陽性T細胞中のテトラマー陽性細胞の割合(%)を示している。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

[実施例1] HLA-A*2402遺伝子およびヒトβ2m遺伝子の単離

ヒトのMHC class Iの1つであるHLA-A*2402遺伝子、およびヒトβ2m遺伝子は、HLA-A24を持つ健常人末梢血単核球(PBMC)由来のメッセンジャーRNA(mRNA)よりクローニングした。mRNAの分離にはMicro-FastTrack Kit(Invitrogen)を用いた。cDNA合成にはAMV-RT First-strand cDNA synthesis kit(LIFE SCIENCE)を用いた。

得られたcDNAを錆型にしてHLA-A*2402遺伝子は、プライマーHLA-5P2, HLA-3Bを用いて、β2m遺伝子はb2m-5', b2m-3'を用いてPCRを行った。

HLA-5P2, 5'-GGGCGGATCCGGACTCAGAACCTCCCCAGACGCCGAG-3' (配列番号: 9)

HLA-3B, 5'-CCGCCTCGAGCTGGGGAGGAAACAGGTCAAGCATGGAAC-3' (配列番号: 10)
)

b2m-5', 5'-GGCACCGAGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGC-3' (配列番号: 11)

b2m-3', 5'-AATTTGGAATTCATCCAATCCAAATGCGGC-3' (配列番号: 12)

PCR は94°C 30秒、58°C 30秒、72°C 1分、35サイクルの後、72°C 7 分で伸長反応を行った。PCRは Ex Taq (Takara) を用いて行った。得られたPCR産物はpGEM-T vector system (Promega) を用いてクローニングし (それぞれA*2402/pGEMおよび β 2m/pGEMとした)、塩基配列をシークエンス反応にて確認した。シークエンス反応は dye terminator chemistry (Big-Dye terminator cycle sequencing Ready Reaction kit; Applied Biosystems) を用い、ABI-377 DNA Sequencer にて電気泳動を行った。

[実施例2] エピトープ結合 β 2m発現ベクターの作製

以下のようにして、エピトープ結合 β 2mを発現するSeVベクターをコードするプラスミド(e/ β 2m/pSeVb)を構築した。 β 2mのシグナル配列の下流への各エピトープ、リンカーの挿入、センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI部位の付加はPCR法によって行った(図1)。リンカーのアミノ酸配列は、GGGS (配列番号: 13)が3回繰り返した配列 (GGGSGGSGGGS/配列番号: 14)となるようにした。

使用したプライマー;

e/b2m-a1, 5'-GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTCTGGTGGAGGTCGATCCAGCGTACTCCAAAGAT
T-3' (配列番号: 15)

e(Nef)-a2, 5'-TCTGGCCTGGAGGCTAGATATCCACTGACCTTGATGGTGCTTCGGAGGAGGTGGCGG
GTCC-3' (配列番号: 16)

e(Env)-a2, 5'-TCTGGCCTGGAGGCTAGATAACCTAACGGATCAACAGCTCCTAGGGATTGGAGGAGGTGGCGG
GTCC-3' (配列番号: 17)

e/b2m-a3, 5'-TGCAGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACT
CTCTCTTCTGGCCTGGAGGCT-3' (配列番号: 18)

b2m-d, 5'-TTGCGGCCGCGATGAACCTTCACCCTAACGTTTCTTACTACGGCGTACGTTACATG
TCTCGATCCCACTT-3' (配列番号: 19)

β 2m/pGEMを鋳型に e/b2m-a1, b2m-d を用いて 94°C 1分、48°C 1分、72°C 1分、にて15サイクル行った後、72°C 7分にて伸長反応を行った。得られたPCR 産物を鋳型としてe(Nef)-a2, あるいは e(Env)-a2 と b2m-d を用いて同条件にて PCR を、さらにその PCR 産物を鋳型として e/b2m-a3 と b2m-d を用いて同条件にて PCR を行い、e/Nef138- β 2m, e/Env584- β 2m 断片を得た。e/Nef138- β 2m, e/Env584- β 2m断片を pGEM-T vector system (Promega) を用いてクローニングし、塩基配列をシークエンス反応にて確認した。塩基配列確認後NotIにて消化し、pSeV1 8+b (+)のNotI切断部位に挿入し、再度塩基配列を確認し e/Nef138- β 2m/pSeVb, e/Env584- β 2m/pSeVb を得た (「e/ β 2m/pSeVb」と総称する)。また、本来の β 2m のみを発現するセンダイウイルス β 2m/pSeVb は b2m-a (5'-TGCAGGCCGCGGTACGGCC GAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' / 配列番号: 20) と b2m-d を用いて上記と同様に β 2m/pSeVb を得た。Nefのエピトープ (Nef138-10) のアミノ酸配列を配列番号: 24に、Envのエピトープ (Env584-11) のアミノ酸配列を配列番号: 26に示す。

[実施例 3] ピオチン化基質ペプチドを付加した分泌型MHC class I重鎖発現ベクターの作製

HLA-A*2402 遺伝子細胞外領域へのBir A substrate peptide (BSP) 配列 (配列番号: 31) とヒスチジンタグ (his), センダイウイルスのE, Sシグナル、NotI 部位の付加は PCRにて行った(図2)。

使用したプライマー;

A24-a, 5'-TGCAGGCCGCGGTACGAGGATGGCCGTATGGCGCCCC-3' (配列番号: 32)

A24-d1, 5'-GTCCCGCAGCTCCATCTTCAATTGCCTCAAAGATTCCCTCCAAGGGATCCCCATCTCAGG GTGAGGGGCTT-3' (配列番号: 33)

A24-d1/his, 5' -CTACGGCGTACGTCAATGGTGGTATGGTGGTGGTCCGCAGCTCCAT-3' (配列番号 : 34)

A24-d2/his, 5' -TTGCGGCCCGATGAACCTTCACCCCTAACGTTTCTTACTACGGCGTACGTCA-3' (配列番号 : 35)

A*2402/pGEM を鋳型として A24-a, A24-d1 を用い94℃ 1分、48℃ 1分、72℃ 1分、にて15サイクル行った後、72℃ 7分にて伸長反応を行った。得られたPCR 産物を鋳型として A24-a, A24-d1his を用いて同様に PCR を行い、さらにその PCR 産物を鋳型として A24-a, A24-d2his を用いて同条件にて PCR を行い、A24-BSP his断片を得た。以下e/β 2m/pSeVb 作製時と同様に A24-BSP his/pSeVb を得た。

[実施例4] 膜結合型MHC class I重鎖発現ベクターの作製

センダイウイルス E, S シグナル、NotI部位の付加は PCR にて行った（図2および3）。

使用したプライマー；

A24-a#, 5' -TGCAGCCGCCGTACGCCGAGGATGCCGTATGGCGCCCCG-3' (配列番号 : 40)

A24-d4, 5' -TTGCGGCCCGATGAACCTTCACCCCTAACGTTTCTTACTACGGCGTACGTACACTTACA AGCTGTGAG-3' (配列番号 : 41)

A*2402/pGEM を鋳型として A24-a#, A24-d4 を用い94℃ 1分、48℃ 1分、72℃ 1分、にて15サイクル行った後、72℃ 7分にて伸長反応を行い、A24full 断片を得た。以下e/β 2m/pSeVb 作製時と同様に A24full/pSeVb を得た。

[実施例5] センダイウイルスベクターの再構成および感染

pSeV18^tb(+), pGEM-L, pGEM-P, pGEM-N, vTF7-3 は Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997, Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466 に記載されている。センダイウイルスベクターの再構成は、上記文献に記載の方法に従って行った。e/Nef 138-β 2m/pSeVb および e/Env584-β 2m/pSeVb から、それぞれ e/Nef 138-β 2m/pSeVb および e/Env584-β 2m/pSeVb を得た (e/β 2m/pSeVb と総称する)。また、A24-BSP his/p

SeVbおよびA24full/pSeVbから、それぞれA24-BSP_{his}/SeVbおよびA24full/SeVbを得た。

サルの腎臓由来細胞株 CV-1 および LLCMK2 は、10% ウシ胎児血清 (FCS) 、100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリン (Life Technologies) を含む MEM (SIGMA) 培地 (M10) にて培養した。以下のセンダイウイルスの感染においては、特に断らない限り、各 m.o.i. にて組換えセンダイウイルスを CV-1 細胞に感染させ、無血清MEMにて三日間培養した。

[実施例 6] エピトープ結合 $\beta 2m$ ($e/\beta 2m$) の回収および定量
 $e/\beta 2m/SeVb$ または $\beta 2m/SeVb$ を感染させた CV-1 細胞の培養上清を、センダイウイルス粒子を除去するため、40,000×g で遠心し上清を回収した。

培養上清中の $e/\beta 2m$ の定量はサンドウィッチ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて行った。Capture 抗体には抗ヒト $\beta 2m$ クロログロブリンモノクローナル抗体 (DAKO) 2.5 μg/ml を、detector 抗体には抗ヒト $\beta 2m$ クロログロブリンモノクローナル抗体ペーオキシダーゼ標識 (DAKO) 500ng/ml を用い、発色には TMB パーオキシダーゼ発色キット (BIO-RAD) を用いた。

標準サンプルに精製ヒト $\beta 2m$ クロログロブリン (Biogenesis) を用いた。

[実施例 7] 分泌型 MHC class I/ペプチド複合体の回収、精製
A24-BSP_{his}/SeVb と $e/Nef138-\beta 2m/SeVb$ あるいは $e/Env584-\beta 2m/SeVb$ とを CV-1 細胞に重感染させた。感染細胞の培養上清を回収し、センダイウイルス粒子を除去するため、40,000×g で遠心し上清を回収、1mM PMSF、3 μg/ml leupeptin、3 μg/ml aprotinin、3 μg/ml pepstatin A を加えた。MHC class I/ペプチド複合体の上清への分泌の確認はサンドwich ELISA 法にて行った。Capture 抗体には抗ヒト MHC class I モノクローナル抗体 (Ancell) 1 μg/ml を、detector 抗体には抗ヒト $\beta 2m$ クロログロブリンモノクローナル抗体ペーオキシダーゼ標識 (DAKO) 250ng/ml を用い、発色には TMB パーオキシダーゼ発色キット (BIO-RAD) を用いた (図 4)。

培養上清はNiSO₄を充填したHitrap-Chelating column (Amersham Pharmacia) を用い、FPLC (Amersham Pharmacia) にて0.02M NaHPO₄, 0.5M NaCl (pH7.4) のバッファー条件にて0から0.5 MのImidazoleの濃度勾配中で溶出した。PD-10 column (Amersham Pharmacia) を用いて溶液を 10mM Tris-HCl (pH8.0) に置換後、Centricon-30 (Amicon) を用いて限外濾過法にて濃縮した(図5)。

[実施例8] MHC class I/ペプチド複合体の作製

ビオチンの付加には Bir A 酵素 (Avidity) を用いた。反応は 1.8 mg/ml MHC class I/ペプチド複合体 1mg を BirA 10 μg と、10mM Tris-Cl (pH8.0), 50mM Bicine (pH8.3), 10mM ATP, 10mM MgOAc, 100 μM biotin 下で25°C、18 時間反応させた。

ビオチン付加 MHC class I/ペプチド複合体の精製は Superdex 200 HR10/30 column (Amersham Pharmacia) を用い FPLCにて 20mM Tris-Cl (pH8.0), 150mM NaCl で行った。その後 PD-10 column を用いて 2mM EDTA を含む PBS に溶液置換し、Centricon-30 を用い限外濾過法にて 2mg/mlに調整した。Streptavidin-RPE (Molecular Probes) とMHC class I/ペプチド複合体 : Streptavidin のビオチン化部位 = 1:1 で反応させることによって多量体化した。

[実施例9] Nef138-10 特異的CTLクローニングの樹立

HLA-A*2402 を持つ HIV-1 感染者の末梢血単核球 (PBMC) を 3×10^5 /96well ずつ R10 100 μlで一晩培養した。次の日に stimulator細胞 (0.2 μg/ml PHA (SIGMA)、10% Lymphocult-T (Bioteest) を含むRPMI1640 (SIGMA) 培地 (R10)で一晩活性化し3,000 rad にて放射線照射を行った後、10 μM のNef138-10 で1時間パルスした自己の PHA-blast) を加え、抗ヒト CD28 1 μg/ml 存在下で2週間培養した。その後1週間おきにstimulator細胞 (10,000 rad で放射線照射し 10 μM Nef138-10 でパルスした自己の Epstein-Barr virus transformed B cell line (B-LCL)) で刺激を加えた。2～4回刺激後、CTL活性が確認できたらクローニングを行った。

クローニングは0.8 cell/well の細胞を 1×10^5 cell/well stimulator細胞 (10,000 rad の放射線照射後、 $10 \mu\text{M}$ Nef138-10 でパルスをした自己の B-LCL)、 5×10^4 cell/well feeder細胞 (3,000 rad で放射線照射した健常人 PBMC) とともに 10% Lymphocult-T, 2.5% PHA-sup (健常人 PBMC ($3 \times 10^6/\text{ml}$) を $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ PHA で 48 時間刺激した培養上清) 存在下で 3～4 週間培養した。

[実施例 10] 膜結合型MHC class I/ペプチド複合体を形成するSeV導入細胞の CTLによる認識

CTL ^{51}Cr 放出アッセイを以下のようにして行った。ヒトCD4 $^+$ Tリンパ球株 H9を10% FCS, 100U/ml ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリンを含むRPMI1640 (SI GMA) 培地 (R10) にて培養した。 2×10^3 cell/well の標的細胞 (ヒトT細胞株 H9) を $100 \mu\text{Ci}$ Na_2CrO_4 で2時間ラベルし、R10 にて3回洗った後、 $10 \mu\text{M}$ のペプチドで1時間パルスした。SeVベクター導入細胞を標的細胞とする場合は、ラベルの17 時間前 (すなわち、エフェクター細胞を添加する20時間前) に図 6 に示す組み合わせでSeVベクターの感染をm. o. i.=10:2で行った。各 E:T 比 (エフェクター細胞 : 標的細胞比) にしたがって実施例 9 の細胞をエフェクター細胞として加え4時間 37°Cでインキュベートし、その上清中の ^{51}Cr を γ カウンターで測定した。自然放出(Spontaneous release)の測定にはエフェクター細胞の代わりに R10 を、最大放出(Maximum release)の測定にはエフェクター細胞の代わりに 4% TritonX-100/PBS を入れた。

特異的リシス (Specific Lysis) (%) は [各サンプルのcpm - 自然放出(Spontaneous release)のcpm] / [最大放出(Maximum release)のcpm - 自然放出(Spontaneous release)のcpm] × 100 で計算した。

膜結合型MHC class I/ペプチド複合体のCTLによる認識を調べた結果を図 6 に示した。A24full/SeVb と e/Nef138-β 2m/SeVb を共導入した細胞において、抗原特異的CTL活性化を検出できることが判明した。

[実施例 11] SeV導入細胞から回収したエピトープ結合 β 2mの効果

SeV導入細胞で產生されたエピトープ結合 β 2mを調製するため、e/Nef138- β 2m/SeVbをH9細胞にm. o. i.=2で導入し、3日後に培養上清を回収し濾過してエピトープ結合 β 2mを含む溶液を得た。A24full/SeVbを感染させたH9を標的細胞として実施例10と同様のCTLアッセイを行い、ペプチドでのパルスと上記で得たエピトープ結合 β 2mを含む溶液でのパルスを比較した。

エピトープ結合 β 2mの効果を図7に示した。SeV導入細胞から回収したエピトープ結合 β 2mを標的細胞の培養液に添加することによって、抗原特異的CTL活性を検出できることが判明した。

[実施例12] MHC class I/ペプチド4量体によるエピトープ特異的CD8陽性T細胞の検出

HLA-A*2402を持つHIV感染者および健常人の末梢血単核球(PBMC)1×10⁶に20μg/mlのMHC class I/ペプチド4量体であるA24/Nef138-10テトラマー-RPE標識を加え、37°Cで15分反応させた。1回洗浄した後、抗CD8抗体-APC標識を加え4°Cで20分反応させた。その後3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS(Phosphate-Buffered Saline)にて固定した。染色および洗浄には2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSを用いた。結果を図8に示した。図はリンパ球分画1×10⁵をA24/Nef138-10テトラマーと抗CD8抗体で展開したもので、図中の数字はCD8陽性T細胞中のテトラマー陽性細胞の割合(%)を示している。

産業上の利用の可能性

本発明により、哺乳動物細胞においてエピトープ結合 β 2mおよびMHC class I/ペプチド複合体を効率的に発現させることが可能となった。得られるエピトープ結合 β 2mおよびMHC class I/ペプチド複合体は、抗原特異的CTLの検出および定量のために、またエピトープ結合 β 2m精製蛋白質を用いた抗原特異的CTLへの抗原提示のために、さらにはインピボおよびエクスピボにおけるベクター導入を介して、抗原特異的細胞性免疫を誘導するために極めて有用である。本発明により得る

ことができるエピトープ結合 $\beta 2m$ およびMHC class I/ペプチド複合体は、自己抗原、あるいはウイルス抗原、腫瘍抗原などに反応するCTLの検出および定量、並びにウイルスやバクテリア等の感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法に有用である。また本発明のベクターは、感染症に対する防御免疫の誘導、および癌に対する免疫療法などにおける遺伝子治療用ベクターとして有用である。

請求の範囲

1. エピトープ結合 $\beta 2m$ を発現可能にコードする哺乳動物細胞感染性ウイルスベクター。
2. 哺乳動物細胞感染性ウイルスペクターがパラミクソウイルスペクターである、請求項 1 に記載のウイルスペクター。
3. パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項 2 に記載のウイルスペクター。
4. エピトープが抗原提示細胞により提示されたエピトープペプチドのアミノ酸配列またはその部分を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のウイルスペクター。
5. エピトープがHIV-1のウイルス蛋白質の部分ペプチドである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のウイルスペクター。
6. エピトープが配列番号：2 4 または 2 6 に記載のアミノ酸配列またはその部分を含む、請求項 5 に記載のウイルスペクター。
7. エピトープが癌抗原の部分ペプチドである、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のウイルスペクター。
8. エピトープと $\beta 2m$ の間に配列番号：1 3 に記載のアミノ酸配列またはその繰返しを含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のウイルスペクター。
9. エピトープ結合 $\beta 2m$ の生産方法であつて、
 - (a) 請求項 1 から 8 のいずれかに記載のウイルスペクターを哺乳動物細胞に導入する工程、
 - (b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、エピトープ結合 $\beta 2m$ を回収する工程、を含む方法。
10. 請求項 9 に記載の方法により生産されたエピトープ結合 $\beta 2m$ 。
11. エピトープ結合 $\beta 2m$ を含む、ヘテロダイマーの生産方法であつて、

(a) 請求項1から8のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したヘテロダイマーを回収する工程、を含む方法。

12. MHC class I 重鎖、およびエピトープ結合 $\beta 2m$ を含む、MHC class I/ペプチド複合体の生産方法であって、

(a) 請求項1から8のいずれかに記載のウイルスベクターを哺乳動物細胞に導入する工程、

(b) 該ベクターが導入された哺乳動物細胞またはその培養上清から、生成したMHC class I/ペプチド複合体を回収する工程、を含む方法。

13. 前記哺乳動物細胞に、MHC class I 重鎖を発現するウイルスベクターを導入する工程をさらに含む、請求項13に記載の方法。

14. MHC class I 重鎖が分泌型である、請求項13に記載の方法。

15. MHC class I 重鎖がビオチン化基質ペプチドを含む、請求項14に記載の方法。

16. MHC class I 重鎖がA24拘束性HLA class I 重鎖である、請求項13から15のいずれかに記載の方法。

17. A24拘束性HLA class I 重鎖がA*2402由来である、請求項16に記載の方法。

。

18. ビオチン化基質ペプチドを含むMHC class I 重鎖をビオチン化する工程、およびビオチン化MHC class I 重鎖をアビシンの存在下で会合させる工程をさらに含む、請求項15に記載の方法。

19. 請求項12から18のいずれかに記載の方法により生産されたMHC class I/ペプチド複合体。

20. 4量体である、請求項19に記載のMHC class I/ペプチド複合体。

21. 請求項1から8のいずれかに記載のウイルスベクター、請求項10に記載

のエピトープ結合 β 2m、あるいは請求項 19 または 20 に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤。

22. 請求項 1 から 8 のいずれかに記載のウイルスベクター、請求項 10 に記載のエピトープ結合 β 2m、あるいは請求項 19 または 20 に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む医薬組成物。

23. 請求項 1 から 8 のいずれかに記載のウイルスベクターが導入された哺乳動物細胞。

24. 請求項 11 に記載のエピトープ結合 β 2m を細胞表面に有する細胞。

25. MHC class I 重鎖をコードする遺伝子が外的に導入されている、請求項 23 または 24 に記載の細胞。

26. MHC class I 重鎖が膜結合型である、請求項 25 に記載の細胞。

27. MHC class I 重鎖が分泌型である、請求項 25 に記載の細胞。

28. 細胞が樹状細胞である、請求項 23 から 27 のいずれかに記載の細胞。

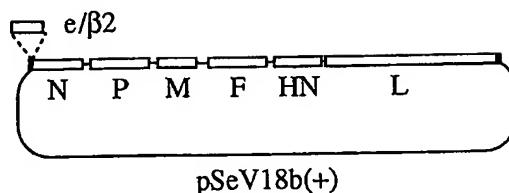
29. 請求項 23 から 28 のいずれかに記載の細胞を含む、抗原特異的細胞性免疫の誘導剤。

30. 請求項 23 から 28 のいずれかに記載の細胞を含む医薬組成物。

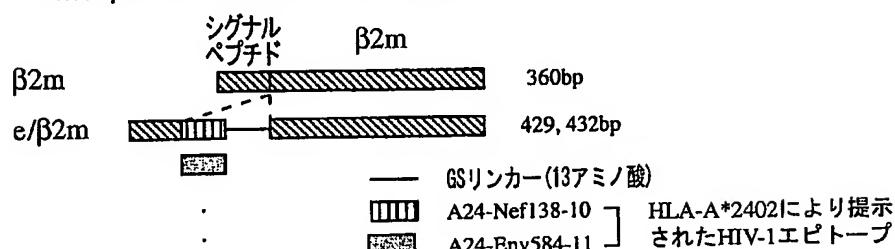
31. 請求項 19 または 20 に記載のMHC class I/ペプチド複合体を含む、抗原特異的Tリンパ球の検出薬。

図 1

e/β 2m/SeVb の作製



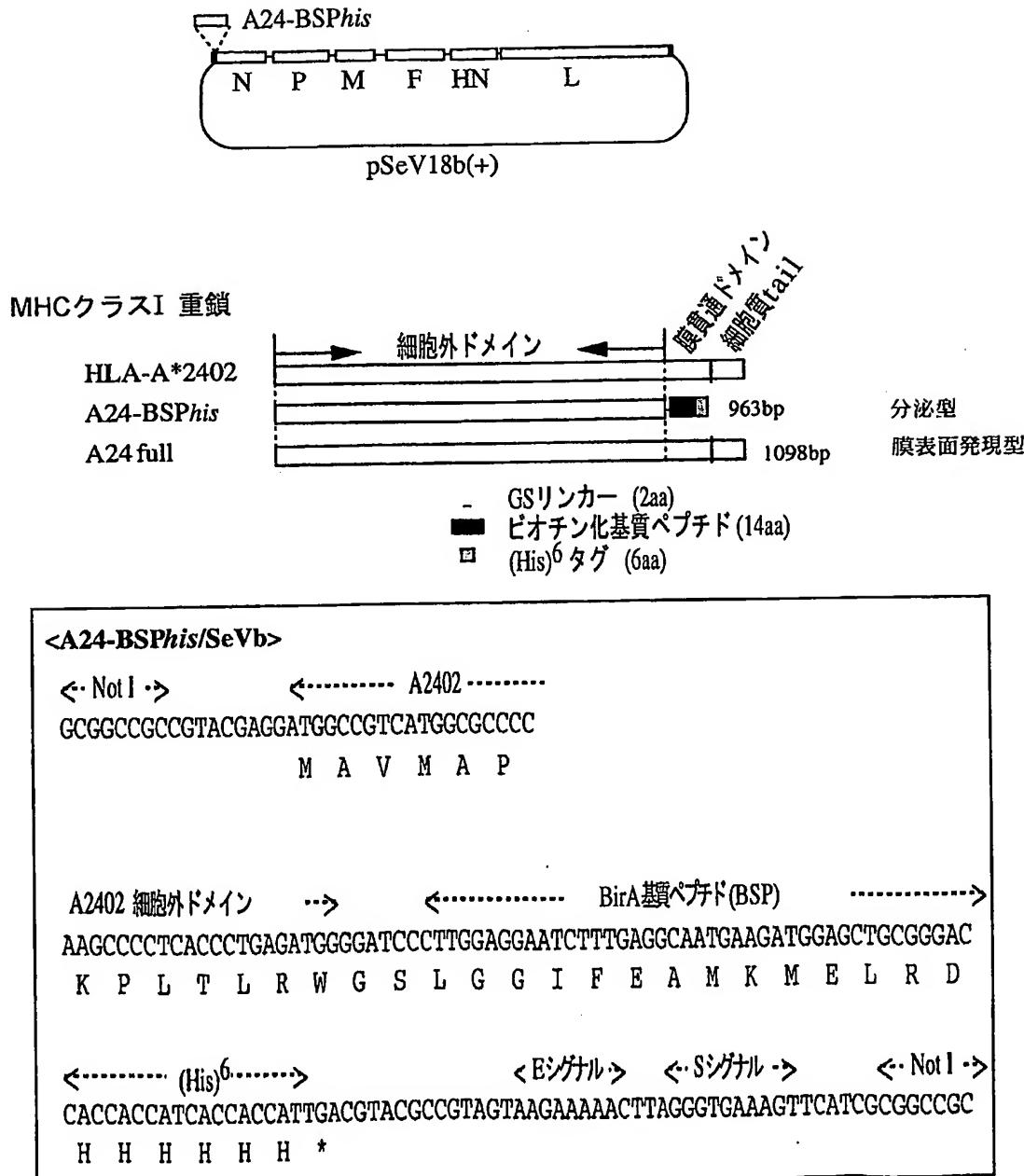
エピトープ結合β2ミクログロブリン (e/β2m)



<.. NotI ..>	<..... β2mシグナル>
GCAGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT		
M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A		
<..... HIV-A24Nef138-10		
AGATATCCACTGACCTTGATGGTGCTTC GGA		
R Y P L T F G W C F G		
<..... HIV-A24Bnv584-11		
AGATAACCTAACGGATCAACAGCTCCTAGGGATT		
R Y L R D Q Q L L G I		
<..... リンカ		
<..... β2m		
GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTCTGGTGGAGGTTGATCCAGCGTACTCCAAGATT		
G G G G S G G G S G G G S I Q R T P K I		
..... β2m		
< Eシグナル > < Sシグナル > < NotI >		
AAGTGGGATCGAGACATGTAACGTACGCCGTAGTAAGAAAAACTTAGGGTGAAAGTTCATCGCGGCCGC		
K W D R D M *		

図 2

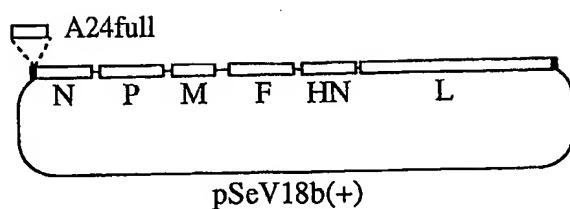
A24-BSPHis/SeVb



3 / 8

図 3

A24full/SeVb



<A24full/SeVb>

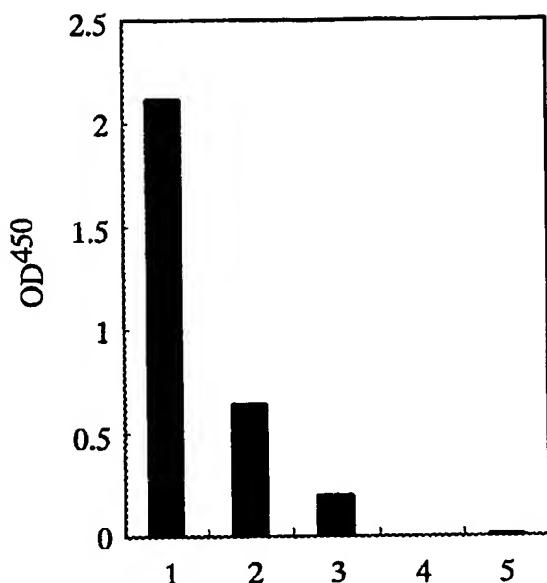
<- Not I -> <..... A2402

GCGGCCGCGGTACGCCGAGGATGGCCGTATGGCGCCC
M A V M A P

..... A2402 < E シグナル > < S シグナル -> <- Not I ->
CTCACAGCTTGTAAAGTGTGACGTACGCCGTAGTAAGAAAAACTTAGGGTGAAAGTTCATGGCGGC
L T A C K V *

4 / 8

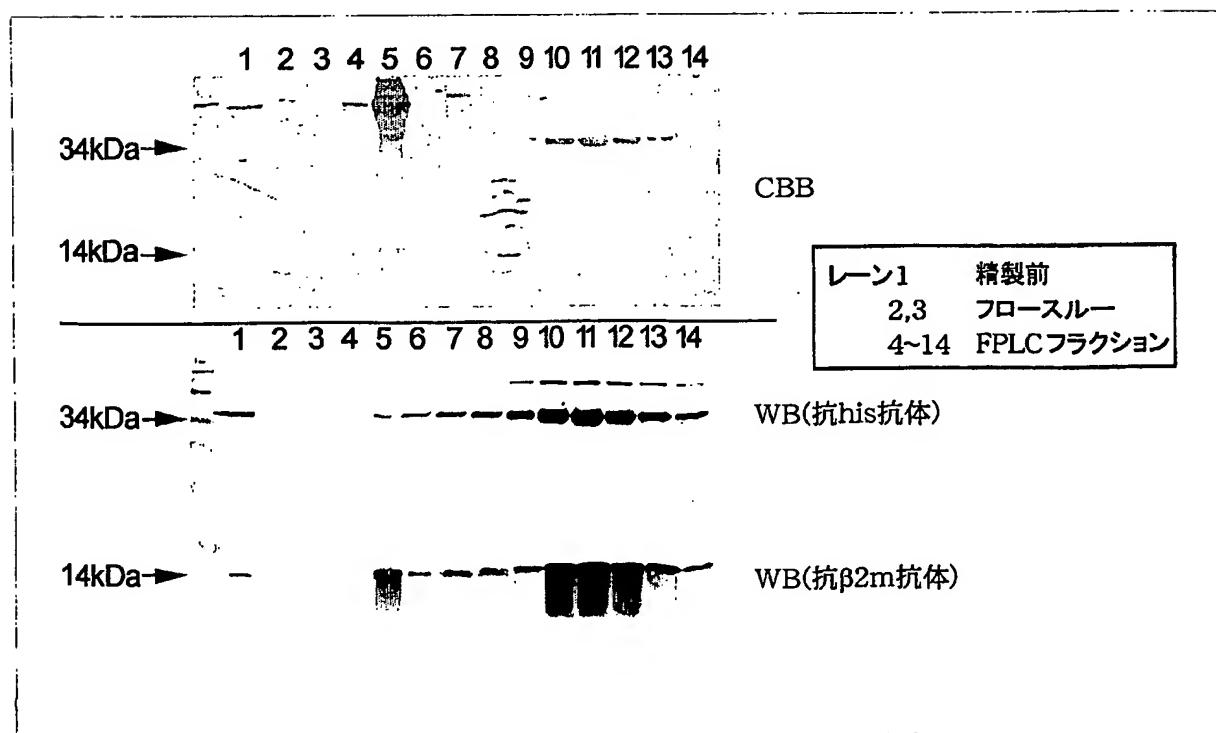
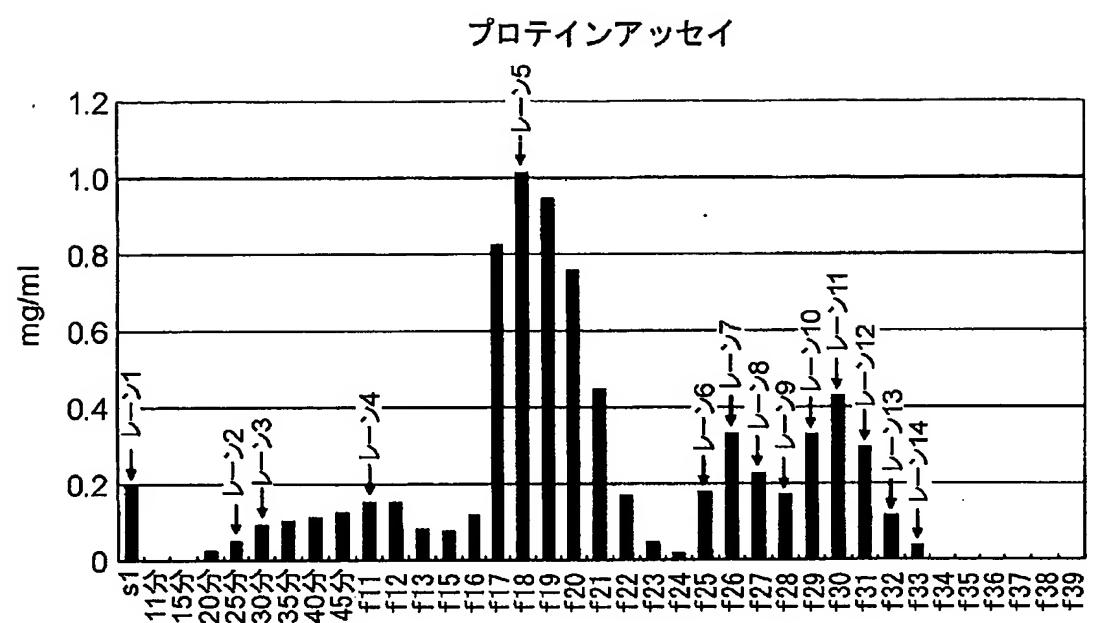
図 4



1. A24-BSP*his*/SeVb + e/Nef138-β2m/SeVb
2. A24-BSP*his*/SeVb + e/Env584-β2m/SeVb
3. A24-BSP*his*/SeVb + β2m/SeVb
4. A24-BSP*his*/SeVb
5. wt/SeV

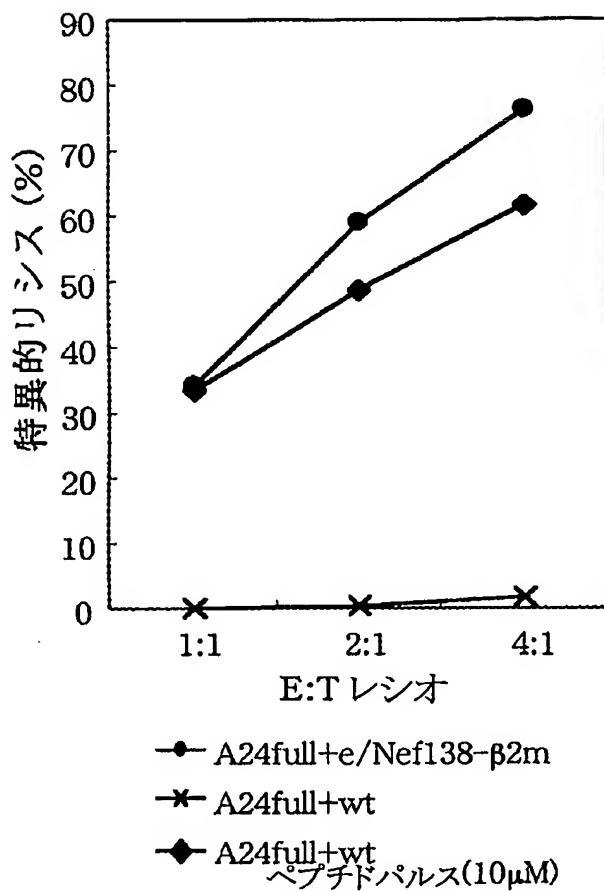
5 / 8

図 5



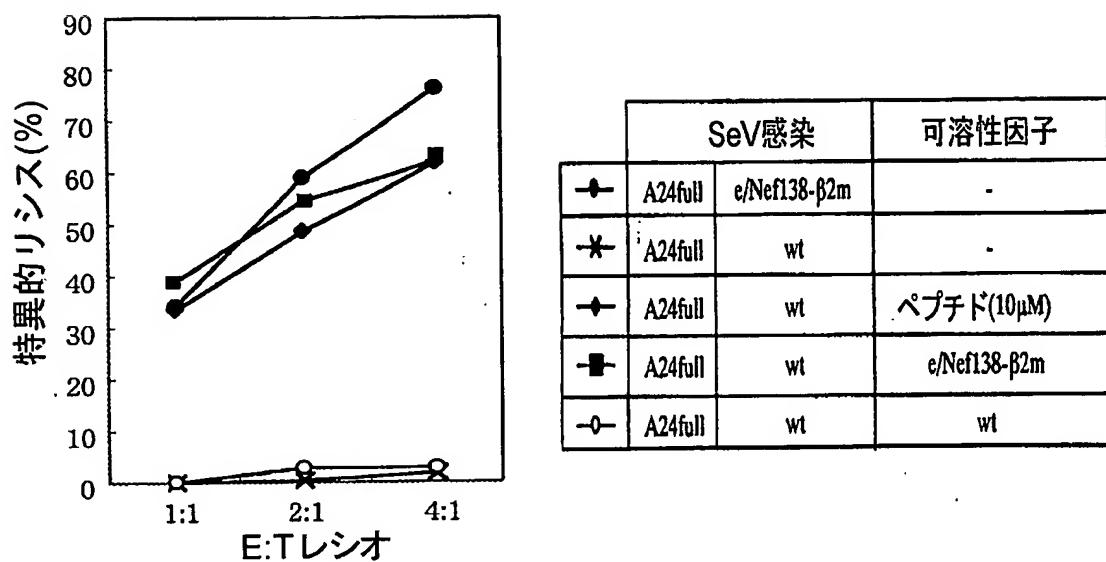
6 / 8

図 6



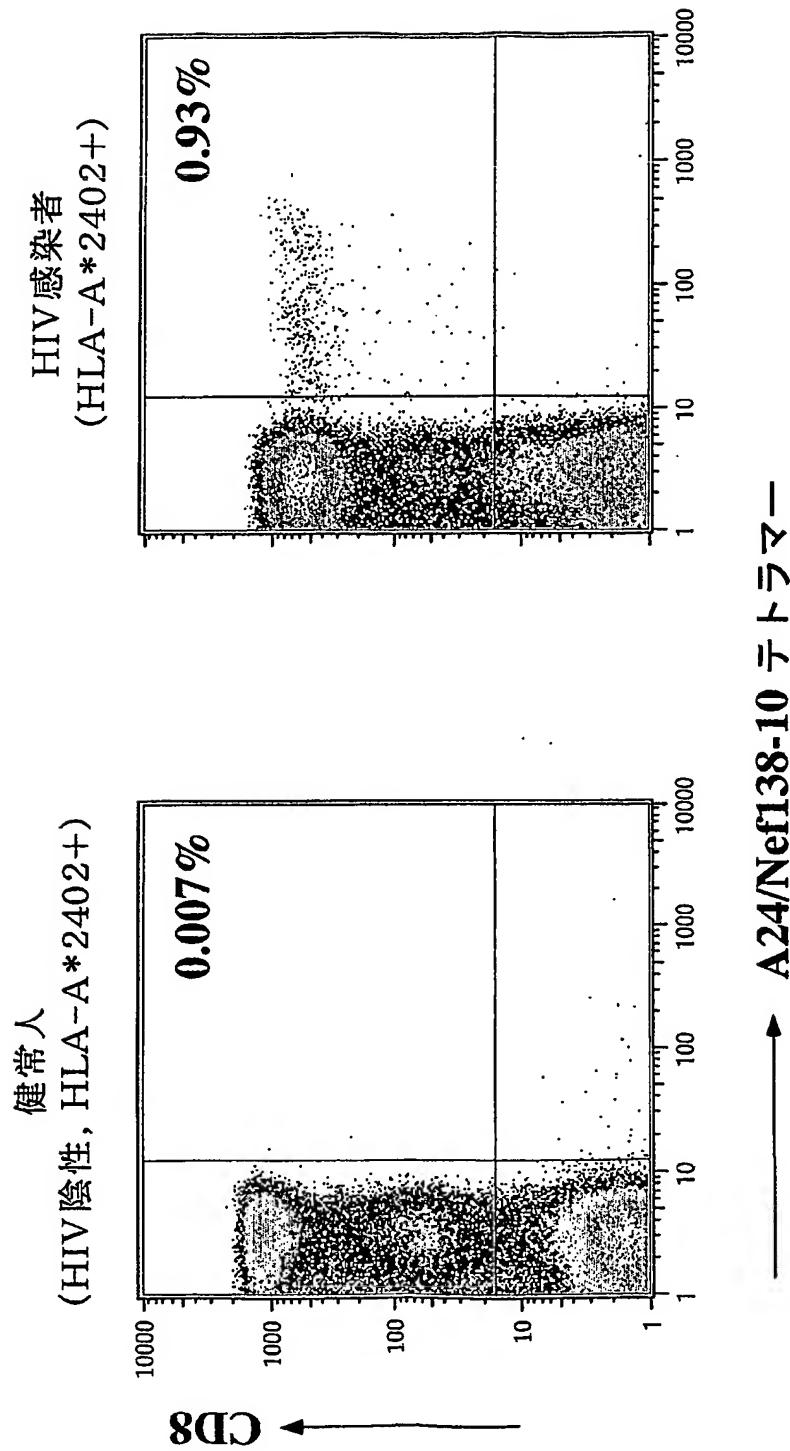
7 / 8

図 7



8 / 8

図 8



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Virus vectors infectious to mammalian cells, which encode epitope-linked beta 2-microglobulin and their uses

<130> D3-A0101P

<140>

<141>

<150> JP 2001-301290

<151> 2001-09-28

<160> 45

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 1

ctttcacccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 3

cggccgcaga tcitcacg

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 4

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 5

gttgagtact gcaagagc

18

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 6

tttgcggca tgcatgtttc ccaaggggag agttttgcaa cc

42

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 7

atgcatgccg gcagatga

18

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 8

tgggtgaatg agagaatcag c

21

<210> 9

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 9

gggcggatcc ggactcagaa tctccccaga cgccgag

37

<210> 10

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 10

ccgcctcgag ctggggagga aacaggtag catggAAC

39

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 11

ggcacgagcc gagatgtctc gtcggcg

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 12

aatttggaat tcatccaatc caaatgcggc

30

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 13

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 14

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1

5

10

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 15

ggagggtggcg ggtccggagg tggttctggt ggaggttcga tccagcgtac tccaaagatt 60

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 16

tctggccatgg aggcttagata tccacatgacc ttggatggt gcttcggagg aggtggcggg 60

tcc

63

<210> 17

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 17

tctggcctgg aggctagata cctaagggat caacagctcc tagggatgg aggtggcg 60

tcc

63

<210> 18

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 18

tgcggccgccc gtaacggccga gatgtctcgcc tccgtggcct tagcttgtgtcg 60

tctctttctg gcctggaggc t

81

<210> 19

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 19

ttgcggccgc gatgaactt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg ttacatgtct 60

cgatcccact t

71

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 20

tgcggccgccc gtacggccga gatgtctcgc tccgtggcct ta 42

<210> 21

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(80)

<400> 21

gcggccgccc tacggccgag atg tct cgc tcc gtg gcc tta gct gtg ctc gcg 53

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala

1

5

10

cta ctc tct ctt tct ggc ctg gag gct 80

Leu Leu Ser Leu Ser Gly Leu Glu Ala

15

20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 22

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser

1

5

10

15

Gly Leu Glu Ala

20

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(30)

<400> 23

aga tat cca ctg acc ttt gga tgg tgc ttc

30

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1 5 10

<210> 24

〈211〉 10

<212> PRT

〈213〉 Artificial Sequence

<400> 24

Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

220

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

220

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 25

aga tac cta agg gat caa cag ctc cta ggg att 33
Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 26

Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile
1 5 10

<210> 27

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(60)

<400> 27

gga ggt ggc ggg tcc gga ggt ggt tct ggt gga ggt tcg atc cag cgt 48

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ile Gln Arg

1

5

10

15

act cca aag att

60

Thr Pro Lys Ile

20

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 28

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg

1

5

10

15

Thr Pro Lys Ile

20

<210> 29

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 29

aag tgg gat cga gac atg taacgtacgc cgttagtaaga aaaactttagg

48

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1

5

gtgaaaagtttc atcgcgcccg c

69

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 30

Lys Trp Asp Arg Asp Met

1

5

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially

synthesized sequence

<400> 31

Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Glu Leu Arg Asp

1

5

10

<210> 32

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 32

tgcggccgccc gtacgaggat ggccgtcatg gcgccccg

38

<210> 33

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 33

gtcccgcagc tccatcttca ttgcctcaaa gatccctcca agggatcccc atcicagggt 60

gaggggctt

69

<210> 34

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 34

ctacggcgta cgtcaatggc ggtgatggtg ggggtccgc agctccat 48

<210> 35

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 35

ttgcggccgc gatgaactt caccctaagt ttttcttact acggcgta cg tca 53

<210> 36

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(36)

<400> 36

gcggccgccc tacgagg atg gcc gtc atg gcg ccc c 36

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 37

Met Ala Val Met Ala Pro

1

5

<210> 38

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(87)

<400> 38

aag ccc ctc acc ctg aga tgg gga tcc ctt gga gga atc itt gag gca 48

Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Gly Ser Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala

1

5

10

15

atg aag atg gag ctg cgg gac cac cac cat cac cat tgacgtacgc 97

Met Lys Met Glu Leu Arg Asp His His His His His

20

25

cgttagtaaga aaaactttagg gtgaaagttc atcgccggccg c

138

<210> 39

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 39

Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Gly Ser Leu Gly Gly Ile Phe Glu Ala

1

5

10

15

Met Lys Met Glu Leu Arg Asp His His His His His

20

25

<210> 40

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<400> 40

tgcggccgccc gtacgccgag gatggccgtc atggcgcccc g

41

<210> 41

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<400> 41

tgcggccgc gatgaacttt caccctaagt ttttcttact acggcgtacg tcacacttt 60

caagctgtga g

71

<210> 42

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (21)..(38)

<400> 42

gcggccgccc tacgccgagg atg gcc gtc atg gcg ccc 38

Met Ala Val Met Ala Pro

1 5

<210> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 43

Met Ala Val Met Ala Pro

1 5

<210> 44

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(18)

<400> 44

c tc aca gct tgt aaa gtg tgacgtacgc cgttagtaaga aaaacctttagg 48

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

gtgaaagttc atcgccggccg c

69

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 45

Leu Thr Ala Cys Lys Val

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09697

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00, A61K45/00,
A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00, A61K45/00,
A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIIDS (STN), SwissssProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tafuro S. et al., "Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules"	1, 4, 7, 8-15, 19, 21-31
Y	Eur. J. Immunol., 2001 Feb., Vol. 31, No. 2, pages 440 to 449, particularly, page 442, left column, Par. No. [0002]; Fig. 1B, and "Discussion"	2, 3, 5, 6, 16-18, 20
X	WO 94/24290 A1 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 27 October, 1994 (27.10.94), Particularly, Claim 8 and example 8	19, 21-31
Y	& AU 9464353 A1 & EP 693125 A1 & US 2002/123108 A1	1-18, 20

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
13 November, 2002 (13.11.02)Date of mailing of the international search report
26 November, 2002 (26.11.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/09697

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Uger, R.A. et al., "Covalent linkage to beta 2-microglobulin enhances the MHC stability and antigenicity of suboptimal CTL epitopes", J. Immunol., 1999, Vol.162, No.10, pages 6024 to 6028, Figs. 2 to 4	19, 21-31 1-18, 20
X Y	Uger, R.A & Barber, B.H., "Creating CTL targets with epitope-linked beta 2-microglobulin constructs", J. Immunol., 1998, Vol.160, No.4, pages 1598 to 1605, Figs. 1, 3	19, 21-31 1-18, 20
X Y	White, J., et al., "Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma" J. Immunol., 1999, Vol.162, No.5, pages 2671 to 2676, Fig. 1	19, 21-31 1-18, 20
X Y	Toshitani, K., et al., "Expression of a single-chain HLA class I molecule in a human cell line: presentation of exogenous peptide and processesd antigen cytotoxic T lymphocytes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol.93, No.1, pages 236 to 240, "Materials and Methods"	19, 21-31 1-18, 20
Y	Kato, A., et al., "The paramyxovirus, Sendai Virus, V protein encodes a luxury function reqired for viral pathogenesis", EMBO J., 1997, Vol.16, No.3, pages 578 to 587, "Discussion"	1-31
Y	WO 01/18223 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 15 March, 2001 (15.03.01), Claims; abstract & AU 2000068720 A & EP 1211318 A1 & KR 2002013565 A	1-31
Y	Ramani, K., et al., "Site-specific gene-delivery in vivo through engineered Sendai viral envelopes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, Vol.95, pages 11886 to 11890, abstract	1-31
Y	WO 01/57204 A1 (KANEDA, Yasufumi), 09 August, 2001 (09.08.01), Abstract & JP 2001-286282 A & EP 1170363 A1	1-31
Y	WO 01/24810 A1 (EPIMMUNE INC.), 12 April, 2001 (12.04.01), pages 186, 362, 192, 364 & AU 2001075001 A	6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int. C1' C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00,
 A61K45/00, A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N15/86, C12P21/02, C07K14/74, C12N5/00,
 A61K45/00, A61K48/00, A61P31/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPI IDS (STN),
 SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Tafuro S. et al. ; "Reconstitution of antigen presentation in HLA class I-negative cancer cells with peptide-beta2m fusion molecules" Eur. J. Immunol., 2001 Feb., Vol. 31, No. 2, pp. 440-449, 特にp. 442左欄第2段落, Fig. 1B及び"Discussion"参照	1, 4, 7, 8-15, 19, 21-31
-		-
Y		2, 3, 5, 6, 16-18, 20
X	WO 94/24290 A1 (BRITISH BIO-TECHNOLOGY LTD.), 1994. 10. 27, 特に請求項8及び実施例8参照	19, 21-31
-		-
Y	& AU 9464353 A1 & EP 693125 A1 & US 2002/123108 A1	1-18, 20

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 11. 02

国際調査報告の発送日

26.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4 B 9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	Uger, R.A., et al; "Covalent linkage to beta 2-microglobulin enhances the MHC stability and antigenicity of suboptimal CTL epitopes" J. Immunol., 1999, Vol. 162, No. 10, pp. 6024-6028, Fig. 2-4参照	19, 21-31
-		-
Y		1-18, 20
X	Uger, R.A. & Barber, B.H.; "Creating CTL targets with epitope-linked beta 2-microglobulin constructs" J. Immunol., 1998, Vol. 160, No. 4, pp. 1598-1605, Fig. 1, 3参照	19, 21-31
-		-
Y		1-18, 20
X	White, J., et al.; "Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma" J. Immunol., 1999, Vol. 162, No. 5, pp. 2671-2676, Fig. 1参照	19, 21-31
-		-
Y		1-18, 20
X	Toshitani, K., et al.; "Expression of a single-chain HLA class I molecule in a human cell line: presentation of exogenous peptide and processed antigen to cytotoxic T lymphocytes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol. 93, No. 1, pp. 236-240, "Materials and Methods"参照	19, 21-31
-		-
Y		1-18, 20
Y	Kato, A., et al.; "The paramyxovirus, Sendai Virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis" EMBO J., 1997, Vol. 16, No. 3, pp. 578-587, "Discussion"参照	1-31
Y	WO 01/18223 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 2001.03.15, 請求の範囲, 要約参照 & AU 2000068720 A & EP 1211318 A1 & KR 2002013565 A	1-31
Y	WO 01/57204 A1 (Kaneda, Yasufumi), 2001.08.09, 要約参照 & JP 2001-286282 A & EP 1170363 A1	1-31
Y	WO 01/24810 A1 (EPIMMUNE INC.), 2001.04.12, pp. 186, 362, 192, 364 参照 & AU 2001075001 A	6

DESCRIPTION

MAMMALIAN CELL-INFECTING VIRUS VECTOR ENCODING EPITOPE-LINKED- β 2m
AND USES THEREOF5 Technical Field

The present invention relates to mammalian cell-infecting virus vectors encoding epitope-linked- β 2m and uses thereof.

Background Art

10 MHC (major histocompatibility complex) class I molecule is a heterodimer consisting of a heavy chain (HC) and β 2-microglobulin (β 2m), that is present on the cell membrane surface of almost every cell. MHC class I molecule comprises a groove formed by the heavy chain that can stow a peptide of around 10 amino acids. The resulting
15 MHC class I/peptide complex is recognized through T cell receptors (TCR) on cytotoxic T lymphocytes (CTL) that play a role in cellular immunity. Thus, the peptide displayed on MHC class I molecule is called an "epitope" (antigenic determinant).

Peptide fragments derived from autoantigens produced in the
20 cytoplasm, virus antigens, and tumor antigens are transported into the rough endoplasmic reticulum via a transporter called TAP (transporter associated with antigen processing) existing on the surface of the rough endoplasmic reticulum, and there they form stable MHC class I/peptide complexes with an MHC class I heavy chain and
25 β 2m. The β 2-microglobulin molecule plays roles in retaining the stability of the 3-dimentional structure of the MHC class I molecule and in the transportation of the heavy chain to the cell surface (Tasuku Honjo and Takeshi Watanabe (ed.), "Immune System: Recognition, differentiation, and proliferation", The Molecular Biology Society
30 of Japan (ed.), Maruzen Co., Ltd., Tokyo: p117-118). An empty MHC class I molecule unbound to a peptide is known to be very unstable under a culture condition of 37°C.

An epitope, i.e., a peptide displayed on MHC class I molecule, is a very important molecule in inducing specific cellular immunity
35 against a certain antigen. Development of peptide vaccines as immunotherapeutic agents against infections with viruses, such as

HIV, or against cancers has been attempted. However, peptides of major epitopes derived from many virus antigens and tumor antigens have weak binding activity to MHC class I molecules. Therefore, generally, when these peptides are used alone as vaccines, no effect can be
5 expected due to their low stability. In 1998, an artificial epitope with amino acid substitutions to enhance the binding ability to MHC class I molecule without losing its antigenicity was effectively used in a clinical study with melanoma patients. However, identification and development of such epitopes with improved stability and
10 antigenicity are troublesome and difficult and not always provide an epitope of interest.

On the other hand, a system using the adjuvant effect of β 2m is under development based on the finding that the stability of a peptide on an MHC class I molecule is enhanced by β 2m.

15 Recently, the expression of MHC class I/peptide complexes wherein epitope peptides are fused with MHC class I molecules and MHC class II molecules or β 2m has been attempted (Uger, R. A. and Barber, B. H., J. Immunol. 160: 1598-1605 (1998); White, J. et al., J. Immunol. 162: 2671-2676 (1999); Kang, X. et al., Cancer Res. 57: 202-205 (1997);
20 Uger, R. A. et al., J. Immunol. 162: 6024-6028 (1999); USP No. 5,869,270). These complexes are reported to exhibit enhanced stability and recognition by CTL compared to the peptides alone, in particular, those constructed with epitopes having weak binding activity to MHC class I molecules, by the fusion of the epitope peptide
25 sequence via a linker to the N-terminus of β 2m (epitope-linked- β 2m; e/ β 2m). However, in these reports, expression vectors for *E. coli* were primarily used, and no report is known wherein a mammalian cell-infecting virus vector is used. Exogenous proteins overexpressed in *E. coli* often form inclusion bodies and are
30 insolubilized. Although these insoluble proteins can be solubilized with denaturing agents such as urea, and then refolded, not all of these insoluble proteins are dissolved, and furthermore, such treatments are rather troublesome. Moreover, possible contamination of *E. coli* components is another cause of concern.

35 The efficiency of gene transfer using expression plasmids for mammalian cells is low and sufficient expression cannot be expected.

Furthermore, another disadvantage of the use of mammalian cell expression plasmids is that they can be only expressed in dividing cells wherein the nuclear membrane disappears due to the need of the plasmids to be transferred into the nucleus for its expression.

5 MHC class I/peptide complexes are also useful for assays of antigen-specific CTL. The method so called limiting dilution assay has been used for the determination of frequency of antigen-specific CTL in individuals. However, it requires a long term *in vitro* culture and has a low sensitivity. Accordingly, "MHC class I/peptide 10 tetrameric complex (tetramer)" that is sensitive and can be simply prepared was developed in 1996 (Altman, J. D. et. al., Science 274: 94-96 (1996)). This tetramer is prepared by tetramerization of a monomeric MHC class I/peptide complex using the biotin-avidin binding system followed by the addition of a fluorescence label and is used 15 for FACS analysis. Since this method allows direct analysis of peripheral blood mononuclear cell samples isolated from individuals, it is not only simple and reflects directly the frequency in each individual, but it also has high sensitivity and high specificity (Wilson, J.D.K. et al., J. Exp. Med. 188: 785-790 (1998); Kuroda, 20 M.J. et al., J. Exp. Med. 187: 1373-1381 (1998)). At present, the MHC class I/peptide complexes that comprise human MHC class I molecules are prepared by independent expression and purification of heavy chains and β 2m proteins in *E. coli*, followed by *in vitro* folding of them with a synthetic peptide.

25 In contrast, in relation with mouse MHC class I molecules, construction of an insect cell-derived MHC class I/peptide complex using a baculovirus vector has been reported (White, J. et al., J. Immunol. 162: 2671-2676 (1999)). In this system, the MHC class I/peptide complex was constructed in cells co-infected with 30 baculoviruses expressing a heavy chain of MHC class I and an epitope-linked- β 2m, respectively. However, there is no report on the use of a mammalian cell-infecting virus vector for this purpose. Since the baculovirus vector system expresses exogenous genes located downstream of a promoter effective in insect cells (for example, Sf9 35 cells), mammalian cells cannot be utilized (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-502990). In

addition, while Punnonen et al. have disclosed a genetic vaccine vector for use in DNA shuffling (Punnonen, J. et al., Genetic Vaccine Vector Engineering, USP Application Serial No. 20010006950), a mammalian cell-infecting virus vector encoding epitope-linked- β 2m has not been
5 reported.

Disclosure of the Invention

The present invention provides mammalian cell-infecting virus vectors encoding epitope-linked- β 2m and uses thereof.

10 The present inventors intended to construct an expression system using a mammalian cell-infecting virus vector to establish an overexpression system of epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complex in mammalian cells. For this purpose, the inventors constructed an expression system of Sendai virus (SeV) for the MHC
15 class I/peptide complex and the epitope-linked- β 2m by adopting a recombinant Sendai virus (rSeV) that can be infected into versatile mammalian cells and allows extremely high expression of transgenes.

20 The inventors used epitopes derived from Nef and Env proteins of HIV as examples for the construction of SeV vector systems that express epitope-linked- β 2m. The inventors succeeded in recovering large amounts of the epitope-linked- β 2m in the form of secreted protein by introducing the recombinant SeV vectors into mammalian cells. The recovered epitope-linked- β 2m was found to form an MHC class I/peptide complex by binding to an MHC class I heavy chain on the cell surface,
25 and had ability to efficiently present the antigen to CTL. Thus, the epitope-linked- β 2m produced by the mammalian cell-infecting virus vector was shown to be useful as a protein preparation. Clinically useful antigen-specific cellular immune response-inducing agents can be obtained by recovering and purifying the epitope-linked- β 2m
30 produced in cells infected with the vector.

Moreover, the present inventors constructed a SeV vector that expresses an MHC class I heavy chain and used it for co-infection into mammalian cells in combination with a SeV vector expressing an epitope-linked- β 2m to recover and purify an MHC class I/peptide complex. Furthermore, using a SeV vector, a secretory MHC class I heavy chain lacking the membrane bound region added with a
35

biotinylation substrate peptide was expressed to yield an MHC class I/peptide complex. This complex was biotinylated, and then an MHC class I/peptide tetramer was constructed via binding the complex through an RPE-labeled avidin. This MHC class I/peptide tetramer is 5 suitably used for the detection and quantification of CTL. This tetramer is glycosylated due to its expression in mammalian cells, and thus is expected to have an increased sensitivity compared with that expressed in an *E.coli* system.

Cells co-infected with SeV vectors expressing HLA-A*2402 and 10 β 2m bound to an epitope derived from the HIV-1 Nef protein were found to be recognized by antigen-specific CTL equivalently or more efficiently compared with pulsed administration of a synthetic epitope peptide derived from the HIV-1 Nef protein. Furthermore, when 15 the effects of epitope-linked- β 2m recovered from cells infected with the SeV vector were examined, antigen-specific CTL responses were successfully induced by the addition of epitope-linked- β 2m into a culture solution of target cells. These findings indicate that the mammalian cell-infecting virus vector encoding epitope-linked- β 2m is useful for *in vivo* or *ex vivo* gene therapy for inducing an 20 antigen-specific immune response. A more efficient immunotherapy than that merely using such peptide vaccines may be achieved by producing a desired MHC class I/peptide complex *in vivo*.

As described above, the inventors established an efficient method for the production of epitope-linked- β 2m in mammalian cells, 25 and produced secretory and membrane-bound MHC class I/peptide complexes that contain the epitope-linked- β 2m. Furthermore, the inventors developed a novel system for generating an MHC class I/peptide tetramer useful for the detection and quantification of endogenous antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). The 30 inventors further presented an antigen to antigen-specific CTL by binding the epitope-linked- β 2m protein prepared by the above described production system to the cell surface MHC class I molecules. Moreover, the inventors established a recognition-inducing system by antigen-specific CTL, through co-infection of target cells with virus 35 vectors expressing epitope-linked- β 2m and an MHC class I heavy chain, respectively.

Using the vector system provided by the present invention, a desired epitope-linked- β 2m can be expressed in large amounts in mammalian cells. The epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complex thus obtained are quite useful in: (1) detecting and 5 quantifying antigen-specific TLC; (2) displaying antigens on MHC class I molecules using purified epitope-linked- β 2m proteins; and (3) inducing antigen-specific cellular immune response via the infection 10 of vectors *in vivo* and *ex vivo*. In particular, the vectors of the present invention are suitably used for the induction of protective immunity against infections with viruses and bacteria, and for immunotherapy against cancers.

The present invention relates to mammalian cell-infecting virus vectors encoding epitope-linked- β 2m and uses thereof. More specifically, this invention relates to:

- 15 (1) a mammalian cell-infecting virus vector that encodes an epitope-linked- β 2m in an expressible manner;
- (2) the virus vector of (1), wherein said mammalian cell-infecting virus vector is a Paramyxovirus vector;
- 20 (3) the virus vector of (2), wherein said Paramyxovirus is Sendai virus;
- (4) the virus vector of any one of (1) to (3), wherein said epitope comprises an amino acid sequence of an epitope peptide presented by an antigen-presenting cell, or a portion thereof;
- 25 (5) the virus vector of any one of (1) to (4), wherein said epitope is a partial peptide of a HIV-1 virus protein;
- (6) the virus vector of (5), wherein said epitope comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24 or 26, or a portion thereof;
- (7) the virus vector of any one of (1) to (4), wherein said epitope is a partial peptide of a tumor antigen;
- 30 (8) the virus vector of any one of (1) to (7), wherein said vector comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 or a repeated sequence thereof between said epitope and β 2m sequences;
- (9) a method for producing an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of:
 - 35 (a) introducing the virus vector of any one of (1) to (8) into a mammalian cell, and

(b) recovering the epitope-linked- β 2m from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof;

(10) an epitope-linked- β 2m produced by the method of (9);

(11) a method for producing a heterodimer comprising an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of:

5 (a) introducing the virus vector of any one of (1) to (8) into a mammalian cell, and

(b) recovering the produced heterodimer from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof;

10 (12) a method for producing an MHC class I/peptide complex comprising an MHC class I heavy chain and an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of:

(a) introducing the virus vector of any one of (1) to (8) into a mammalian cell, and

15 (b) recovering the produced MHC class I/peptide complex from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof;

(13) the method of (12), wherein said method further comprises the step of introducing a virus vector expressing the MHC class I heavy chain into the mammalian cell;

20 (14) the method of (13), wherein said MHC class I heavy chain is a secretory form;

(15) the method of (14), wherein said MHC class I heavy chain comprises a biotinylation substrate peptide;

25 (16) the method of any one of (13) to (15), wherein said MHC class I heavy chain is an A24-restricted HLA class I heavy chain;

(17) the method of (16), wherein said A24-restricted HLA class I heavy chain is derived from A*2402;

30 (18) the method of (15), wherein said method further comprises the steps of biotinylating said MHC class I heavy chain comprising the biotinylation substrate peptide and assembling the biotinylated MHC class I heavy chain in the presence of avidin;

(19) an MHC class I/peptide complex produced by the method of any one of (12) to (18);

35 (20) the MHC class I/peptide complex of (19), wherein said complex is a tetramer;

(21) an inducer of antigen-specific cellular immune response comprising the virus vector of any one of (1) to (8), the epitope-linked- β 2m of (10), or the MHC class I/peptide complex of (19) or (20);

5 (22) a pharmaceutical composition comprising the virus vector of any one of (1) to (8), the epitope-linked- β 2m of (10), or the MHC class I/peptide complex of (19) or (20);

(23) a mammalian cell, wherein the virus vector of any one of (1) to (8) has been introduced;

10 (24) a cell that has the epitope-linked- β 2m of (10) on the cell surface;

(25) the cell of (23) or (24), wherein a gene encoding an MHC class I heavy chain has been exogenously introduced;

15 (26) the cell of (25), wherein said MHC class I heavy chain is a membrane-bound form;

(27) the cell of (25), wherein said MHC class I heavy chain is a secretory form;

(28) the cell of any one of (23) to (27), which is a dendritic cell;

20 (29) an inducer of antigen-specific cellular immune response comprising the cell of any one of (23) to (28);

(30) a pharmaceutical composition comprising the cell of any one of (23) to (28); and

25 (31) a detection agent for antigen-specific T lymphocytes comprising the MHC class I/peptide complex of (19) or (20).

According to the present invention, the term "epitope" refers to a peptide recognized by immune cells. Such immune cells include T cells, B cells, NK cells, and NKT cells. A preferable embodiment of the epitope in this invention includes a peptide recognized by T cells. The epitopes of the present invention include not only those presented by antigen-presenting cells, but may be any desired peptide so long as it is recognized by an immune cell. For example, a peptide having an artificially prepared amino acid sequence may also be used as the epitope. More preferably, the epitope of the present invention is a peptide presented by an antigen-presenting cell (APC) or a portion thereof. In the present invention, a "portion" of a protein or peptide

to be used as an epitope contains generally 8 or more, preferably 9 or more, more preferably 10 or more, 12 or more, or 15 or more continuous amino acids.

The present invention provides a mammalian cell-infecting virus vector that encodes an epitope-linked- β 2m. There is no limitation on the mammalian cell-infecting virus vector and any desired virus vector may be used. In addition, the mammalian cell-infecting virus vector of the present invention may have an ability to infect cells other than mammalian cells. Preferably, the vector is less toxic to host cells and achieves a high expression level of a transgenes. The virus vectors used in this invention include, for example, adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, herpes simplex virus vectors, retrovirus vectors, lentivirus vectors, Semliki forest virus vectors, Sindbis virus vectors, vaccinia virus vectors, fowl pox virus vectors, and Sendai virus vectors, but are not limited thereto. Using these vector systems, a recombinant virus vector expressing the epitope-linked- β 2m may be constructed. The phrase "recombinant virus vector" used herein refers to a virus vector generated via a recombinant polynucleotide. The recombinant polynucleotide is defined as a polynucleotide that is not bound as in natural state. More specifically, it refers to artificially recombined polynucleotide chains or newly generated polynucleotides. The "recombinant" virus vector includes, for example, those constructed by gene manipulation and that prepared by gene amplification of the constructed vectors. The recombinant virus vectors may be generated by reconstituting virus particles through the expression of recombinant virus cDNA in host cells.

The recombinant virus vectors may be prepared according to methods known to those skilled in the art. For example, an adenovirus vector that is most frequently used for gene therapy can be constructed according to the method of Saito et al. (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-24 (1996); Kanegae et al., "Biomanual Series 4- Gene Transfer and Expression, Methods of Analysis" (in Japanese), 43-58(1994), Yodosha). For example, a 42 kb cosmid pAdex1cw (Kanegae et al., Saiboukougaku, 13 (8): 757-763 (1994)) that contains a 31 kb Ad DNA, almost the full-length adenovirus (Ad) type 5 genome except

for E1 and E3 regions, is cleaved with an appropriate restriction enzyme (for example, *SwaI*), and then properly desalted and purified by gel filtration. An expression unit for exogenous genes is then used for a ligation reaction with the cleaved cosmid using T4 DNA ligase, and the enzyme is inactivated by heat treatment. The resulting ligate is desalted by gel filtration, and then cleaved with *SwaI*. After phenol treatment and gel filtration, the cleaved product is subjected again to *SwaI* cleavage. A portion of the product is used for *in vitro* packaging using Gigapack XL (Stratagene, USA). The ligated product is then introduced into *E.coli* cells. Cosmids are prepared from some of ampicillin-resistant transformants of the cells, their structures are analyzed by digestion with restriction enzymes to isolate recombinant cosmids wherein the exogenous gene expression unit is inserted in the desired direction (opposite direction to that of the transcription of E1A and E1B). In another series, a DNA-terminal protein complex (DNA-TPC) of adenovirus type 5 (Ad5 strain d1X) that lacks E1 and E3 regions is prepared by the method of Saito et al. (Kanegae et al., *supra*). This complex is digested, for example, with *EcoT22I*, and then desalted and purified by gel filtration and such. The *EcoT22I*-digested fragments are mixed with the recombinant cosmid obtained as described above, and then introduced into 293 cells using, for example, Cellphect kit (Pharmacia, Sweden). On the next day, the transfected 293 cells are suspended, and the suspension and 10-fold to 100-fold dilution thereof are inoculated onto 96-well plates. Approximately 2 weeks after, a culture solution containing dead cells is isolated from the wells wherein propagation of recombinant Adenovirus (generated via the recombination in the 293 cells) could be observed. The culture solution is repeatedly frozen and thawed to release the adenovirus particles from cells. After centrifugation, the supernatant (primary virus solution) is used for infection of 293 cells spread onto 24-well plates. Three days later, culture solution containing dead cells is isolated. A portion of the solution is frozen and thawed, and centrifuged as for the preparation of the primary virus solution to obtain the supernatant (secondary virus solution). The residual solution is centrifuged to obtain cells. DNA is prepared from the

cells and the structure of the recombinant adenovirus DNA is analyzed by digestion with restriction enzymes to select clones that have been confirmed to have the desired DNA structure. The secondary virus solution is used for infection of 293 cells in larger amounts, the 5 culture solution is similarly frozen, thawed and centrifuged to obtain the third virus solution. After determining the titer of the third virus solution according to the method of Saito et al. (Kanegae et al., *supra*), it may be used as the vector (Miyake et al., *supra*; Kanegae et al., *Acta Paediatr. Jpn.*, 38: 182-188 (1996)).

10 In addition, for example, retrovirus vectors (Wakimoto et al., *Protein Nucleic Acid and Enzyme* 40: 2508-2513 (1995)) and adeno-associated virus vectors (Tamaki et al., *Protein Nucleic Acid and Enzyme* 40: 2532-2538 (1995)) may also be used. Methods to efficiently produce these vectors are known in the art.

15 In the interest of producing other vectors that can be used for gene transfer into mammalian cells, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-502069, Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Hei 6-95937, and JP-B Hei 6-71429 disclose detailed methods for producing recombinant 20 vaccinia viruses. Furthermore, JP-B Hei 6-34727 and Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-505626 disclose methods for producing recombinant papilloma viruses. Moreover, Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Hei 5-308975 discloses a method for producing recombinant 25 adeno-associated virus, and Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-508039 discloses a method for producing recombinant adenovirus.

By introducing the obtained virus vectors into mammalian cells, an epitope-linked- β 2m is expressed and obtained either from the cells 30 or the culture supernatant thereof. The recovered epitope-linked- β 2m is useful for the induction of antigen-specific cellular immune response. For example, an epitope may be presented by adding the epitope-linked- β 2m to antigen-presenting cells. Alternatively, a desired epitope can be efficiently presented by introducing the virus 35 vector expressing the epitope-linked- β 2m into antigen-presenting cells. The epitope may be connected with any site of β 2m, but

preferably, for example, it is connected to the N-terminus of the secreted β2m. For this purpose, the epitope is connected downstream of the secretory signal sequence of β2m, and the β2m protein is linked to the epitope, if necessary via a spacer sequence, to yield a fusion 5 protein. There is no limitation on the β2m to be used, and any desired mammalian β2m may be used. However, when used for humans, human β2m is preferred. The human β2m gene may be isolated according to the method as described in the Examples below.

Furthermore, when both genes encoding epitope-linked-β2m and 10 a secretory form (also referred to as soluble form) MHC class I heavy chain are introduced into the same mammalian cell, then the MHC class I/peptide complex is secreted into the culture supernatant, allowing easy recovery of the complex. The secretory form MHC class I heavy chain may be introduced into mammalian cells through a virus vector 15 or may be expressed via integration of its gene into the cellular chromosomal DNA. When a biotinylation substrate peptide is attached to the secretory form MHC class I heavy chain, a tetramer of the biotinylated MHC class I/peptide complex can be produced using avidin. Such a tetramer is in particular useful for the detection and 20 quantification of CTL.

When both genes encoding the epitope-linked-β2m and a membrane-bound form MHC class I heavy chain are introduced into a mammalian cell, a large amount of MHC class I/peptide complex is expressed on the cell surface. Such a cell has an excellent 25 antigen-presenting ability to the epitope-specific CTL.

When expressing an MHC class I heavy chain using a virus vector, the vector is not limited in any way and any desired virus vector may be used similarly as to the virus vectors expressing epitope-linked-β2m as described above. Alternatively, the 30 epitope-linked-β2m and the MHC class I heavy chain may be co-expressed from the same vector by inserting the gene encoding the MHC class I heavy chain into a virus vector that expresses the epitope-linked-β2m. The vector of this invention includes such a co-expression vector that expresses other exogenous genes in addition to the 35 epitope-linked-β2m. There is no limitation on the MHC class I heavy chain, but human MHC class I (HLA) is preferred when applied to humans.

In the Examples, the inventors used A24-restricted HLA class I heavy chain as the MHC class I molecule and a HIV-1-derived epitope presented by the A24-restricted HLA class I molecule as an epitope. Human MHC class I molecules are called human leukocyte antigens (HLA) and are very rich in variety. Among them, about 70% of Japanese have the genotype HLA-A*2402. In the present invention, the A24-restricted HLA class I heavy chain, in particular, HLA-A*2402 is preferred as the MHC class I heavy chain when used for Japanese. A tailor-made medicine is expected to be attained though the selection of an epitope to be bound to β 2m and/or MHC class I molecule that matches the patient's MHC type.

The present inventors also discovered that the use of a mammalian cell-infecting virus vector enables extremely efficient production of desired secretory form multimeric protein complexes in cells. In particular, secretory forms of homo- or hetero dimers or trimers can be produced with high efficiency using the mammalian cell-infecting virus vectors according to the present invention. For example, even a heteromer protein that is endogenously present on the cell membrane can be secreted extracellularly by expressing it as a protein lacking the transmembrane domain using the mammalian-cell infecting virus vectors as described in the Examples. When producing secretory multimers, such as dimers and trimers, according to the present invention, component proteins of the multimers may be expressed using the mammalian-cell infecting virus vectors. All of these component proteins may be expressed using the mammalian cell-infecting virus vectors, or when the endogenous expression level of some of the components is high enough, only a part of the component proteins such as those with low endogenous expression levels, may be selectively expressed using the mammalian cell-infecting virus vectors. One of the most preferable secretory multimers to be expressed according to this method includes the MHC class II complex. This complex is a double-stranded heterodimer consisting of α and β heavy chains. One of the chains may be fused with an epitope to produce a complex similarly to the above-described method used for the production of the epitope-linked- β 2m or the epitope-bound MHC class I heavy chain. Another preferable candidate for a secretory

form multimer to be expressed using the present method includes T cell receptors. Other candidates include, for example, various cytokines and chemokines that form hetero- or homo-dimers or trimers. Specific examples include heterodimers or trimers such as IL-2, IL-4, 5 IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, GM-CSF, and homodimers like NK receptors, but are not limited thereto. More specifically, the present invention also provides:

- (1) a mammalian cell-infecting virus vector that encodes a component of a secretory multimer in an expressible manner;
- 10 (2) the virus vector of (1), wherein said vector is a Paramyxovirus vector;
- (3) the virus vector of (2), wherein said Paramyxovirus is Sendai virus;
- 15 (4) the virus vector of any one of (1) to (3), wherein said secretory multimer is a secretory homo- or heterodimer, or a secretory homo- or heterotrimer;
- 20 (5) the virus vector of (4), wherein said secretory multimer is selected from the group consisting of MHC class II complex, T cell receptor, NK receptor, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-3, IL-5, and GM-CSF;
- (6) the virus vector of (5), wherein said secretory multimer is an epitope-linked MHC class II complex;
- (7) a method for producing a secretory multimer, which comprises the steps of:
 - 25 (a) introducing the virus vector of any one of (1) to (6) into a mammalian cell, and
 - (b) recovering the secretory multimer from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof;
- 30 (8) a secretory multimer produced by the method of (7); and
- (9) a mammalian cell introduced with the virus vector of any one of (1) to (6).

In the present invention, particularly preferred mammalian cell-infecting virus vectors include Paramyxovirus vectors. Herein, the phrase "Paramyxovirus vectors" refers to vectors (or carriers) derived from Paramyxovirus and that transfer genes into host cells. 35 Sendai virus (SeV), which belongs to the family *Pramyxoviridae*, has

currently been developed as a gene transfer vector (Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-589 (1997); WO 97/16538; WO 97/16539). The SeV vector is less toxic and expresses extremely high amounts of proteins from a transferred gene. Furthermore, since genes inserted into the vector 5 are not introduced into the host chromosomes, the SeV vector has an advantage in safety. The SeV vector has a high genome stability, and according to a heterogeneous gene expression experiment, it is shown to stably express the inserted heterogeneous gene for a long time with little mutations in the bases of the gene in spite of continuous 10 multiple passages (Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466 (1997)). In addition, the size of the gene that can be introduced and the flexibility of packaging due to the lack of capsid structure protein is another advantageous property of the SeV vector. The SeV vector with replication ability allows introduction of an exogenous gene 15 of at least up to 4 kb. In addition, two or more genes may be simultaneously expressed by adding transcription units to the vector. Virus vectors replicated from a vector based on the replicon of SeV reinfect into adjacent cells. Then, multiple copies of RNP replicated in the cytoplasm of the infected cells distribute over daughter cells 20 during cell division, and thus the vector is expected to continuously express. Moreover, the SeV vector has a wide tissue adaptability.

Since Paramyxovirus vectors are not pathogenic in humans, they can be suggested to be preferably utilized in clinical trials of human 25 gene therapy in view of safety. It is a major obstacle in high efficient gene transfer that, in most cases, introduced DNA must be transported into the nucleus or nuclear membrane must be eliminated for the expression of a transgene via plasmid DNA or such. In the case of Sendai virus, however, expression of an exogenous gene is driven by both cellular tubulin and its RNA polymerase (L protein) 30 in the cytoplasm when virus genomes replicate. This suggests that the Sendai virus does not interact with chromosomes of host cells, which avoids risks such as cancerization and immortalization of cells. Furthermore, the Sendai virus is known to be pathogenic in rodents 35 causing pneumonia, but not in humans, which is supported by studies showing that the intranasal administration of the wild-type Sendai virus does not do harm in nonhuman primates (Hurwitz, J. L. et al.,

Vaccine, 15: 533-540 (1997)). These features suggest that Sendai virus vector can be utilized in human therapy, and further support the notion that Sendai virus vectors can be one of the promising tools for gene therapy with the aim of *in vivo* or *ex vivo* expression of epitope-linked β 2m.

The Paramyxovirus vector of the present invention may be ribonucleoprotein (RNP) or a virus particle possessing infectivity. Herein, the term "infectivity" refers to an ability of the recombinant Paramyxovirus vector to transfer a gene contained in the vector into cells to which the vector adheres due to its cell adhesion and membrane fusion abilities. The Paramyxovirus vector of the present invention may have replication ability, or may be a defective vector without the replication ability. Herein, "replication ability" is defined as the ability of virus vectors to replicate and produce infective virus particles in host cells infected with the virus vectors. Host cells include, for example, LLC-MK2 and CV-1. Details of the present invention are described below using the Paramyxovirus vector as an example, however, the virus vectors of the present invention are not limited thereto, and further include other virus vectors that can be constructed based on the description below.

Herein, the term "Paramyxovirus" is defined as a virus of the *Paramyxoviridae* family or a derivative thereof. Paramyxoviruses used in the present invention include, for example, viruses belonging to the *Paramyxoviridae* such as Sendai virus, Newcastle disease virus, Mumps virus, Measles virus, Respiratory syncytial virus, rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and type I, II, and III human parainfluenza virus. Preferred virus of the present invention include those belonging to the subfamily *Paramyxoviridae* (including the genera of Respirovirus, Rubulavirus, and Mobillivirus), more preferably the genus Respirovirus (also called Paramyxovirus) or a derivative thereof. Respiroviruses that can be used in the present invention include, for example, type I human parainfluenza virus (HPIV-1), type III human parainfluenza virus (HPIV-3), type III bovine parainfluenza virus (BPIV-3), Sendai virus (also called type I mouse parainfluenza virus), and type X simian parainfluenza virus (SPIV-10). Most preferable Paramyxovirus of the

invention is Sendai virus. These viruses may be naturally occurring, wild-type, mutant, laboratory-passaged, artificially constructed strains, etc. Incomplete viruses such as the DI particle (Willenbrink, W. and Neubert, W.J., J. Virol. 68: 8413-8417 (1994)) and synthesized oligonucleotides may be utilized as a material for generating the virus vector of the present invention.

Genes encoding proteins of a Paramyxovirus include NP, P, M, F, HN, and L genes. Herein, the "NP, P, M, F, HN, and L genes" represent those encoding the nucleocapsid protein, phosphoprotein, matrix protein, fusion protein, hemagglutinin-neuraminidase, and large protein, respectively. Genes of each virus of the subfamily Paramyxovirus are described generally as follows. In general, NP gene may also be indicated as "N gene".

Respirovirus	NP	P/C/V	M	F	HN	-	L
Rublavirus	NP	P/V	M	F	HN	(SH)	L
Morbillivirus	NP	P/C/V	M	F	H	-	L

For instance, the accession numbers of each gene of the Sendai virus classified as a Respirovirus genus of *Paramyxoviridae* in the nucleotide sequence database, are M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, and X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, and X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene. As used herein, the term "gene" refers to a genetic substance, including nucleic acids such as RNA and DNA. There is no restriction as to the origin of genes and it can be a naturally-occurring sequence or an artificially designed sequence. Furthermore, as used herein, the term "DNA" includes single-stranded DNA and double-stranded DNA.

Paramyxovirus vectors used in the present invention is not particularly limited. For instance, preferable Paramyxovirus vectors include vectors that are able to replicate and autonomously proliferate. In general, for example, the genome of wild type

Paramyxoviruses contain a short 3' leader region followed by six genes encoding nucleocapsid (N), phospho (P), matrix (M), fusion (F), hemagglutinin-neuraminidase (HN), and large (L) proteins, and has a short 5' trailer region on the other terminus. Vectors of the present invention that are able to replicate autonomously can be obtained by designing a genome having a similar structure to that as described above. In addition, a vector for expressing a gene encoding epitope-linked β2m and/or MHC class I heavy chain can be obtained by inserting the gene to the genome of the above vector. Paramyxovirus vectors of the invention may have an altered alignment of virus genes on the vector, compared with wild type viruses.

Paramyxovirus vectors of the present invention may have any deletion of the genes that are contained in the wild-type Paramyxovirus. For instance, when Sendai virus vectors are reconstituted, proteins encoded by NP, P/C, and L genes are thought to be required in trans, but the genes themselves may not be a component of virus vectors of the present invention. For example, an expression vector carrying genes encoding the proteins may be co-transfected into host cells with another expression vector encoding the vector genome to reconstitute a vector. Alternatively, an expression vector encoding the virus genome is introduced into host cells carrying genes encoding the proteins, and then the vector can be reconstituted by using the proteins derived from the host cell. The amino acid sequence of these proteins may not be identical to those derived from the original virus as long as it has an equivalent or higher activity in nucleic acid transfer, and may be mutated or replaced with that of a homologous gene of another virus.

Proteins encoded by M, F, and HN genes are thought to be essential for cell-to-cell propagation of a Paramyxovirus vector. However, these proteins are not required when a Paramyxovirus vector is prepared as RNP. If genes M, F, and HN are components of the genome contained in RNP, products of these genes are produced when introduced into host cells, and virus particles having infectivity are generated. RNP vectors that produce an infective virus include, for example, a viral genomic RNA encoding N, P, M, F, HN, and L genes and N, P, and L proteins. When such RNP is introduced into cells, virus genome

is expressed and replicated through functions of N, P, and L proteins, and thus infective virus vectors are amplified. Thus, the Paramyxovirus vector can be amplified by introducing the RNP that is generated during the reconstitution process of the Paramyxovirus 5 vector and such into host cells, such as LLC-MK2 cells, and culturing the introduced cells. This amplification includes the steps of: (a) introducing a negative single-stranded RNA derived from Paramyxovirus and a complex consisting of NP, P/C, and L-proteins into a cell, and (b) culturing the introduced cell and recovering the virus particles 10 from the culture supernatant thereof.

RNP can be introduced into cells as a complex with, for example, lipofectamine and polycationic liposome. Specifically, a variety of transfection reagents can be used, for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and DOSPER (Boehringer 15 #1811169). Chloroquine may be added to prevent degradation in the endosome (Calos, M.P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015 (1983)). For replicative viruses, the produced viruses can be amplified or passaged by re-infecting into cultured cells, chicken eggs, or animals (e.g., mammalian such as mice).

Paramyxovirus vectors lacking the M, F, and/or HN genes are also used as Paramyxovirus vectors of the present invention. These virus vectors can be reconstituted by providing deleted gene products exogenously. Such vectors can still adhere to host cells and induce cell fusion like the wild-type virus. However, daughter virus 20 particles do not have the same infectivity as the parent ones because the vector genome introduced into cells lacks one or more of these genes. Therefore, these vectors are useful as safe virus vectors that are capable of only a single gene transfer. For example, genes deleted from the genome may be F and/or HN genes. Virus vectors can be 25 reconstituted by co-transfection of an expression plasmid encoding the genome of a recombinant Paramyxovirus lacking the F gene, with an expression vector for the F protein, and that for NP, P/C, and L proteins into host cells (International Publication numbers WO 00/70055 and WO 00/70070). Alternatively, host cells in which the 30 F gene is integrated into the chromosome may be used. The amino acid sequence of these proteins provided exogenously may not be identical 35

to those of the wild-type and may be mutated or replaced by a homologous protein of another virus as long as they provide equivalent or higher gene transfer activity.

The envelope protein of the virus vectors of the invention may contain a protein other than the envelope protein of the original vector genome. For example, virus vectors having desired envelope proteins can be produced by intracellularly expressing envelope protein other than that encoded by the virus genome during viral reconstitution. There is no limitation on such proteins. These include envelope proteins of other viruses such as the G protein (VSV-G) of the vesicular stomatitis virus (VSV). Thus, virus vectors of the invention include a pseudo-type virus vector that has an envelope protein derived from a virus different from the original virus.

Viral vectors of the present invention may also comprise, for example, on the viral envelop surface, proteins capable of adhering to particular cells, such as adhesion factors, ligands and receptors or chimeric proteins comprising a protein described above on the outer surface and viral envelop-derived polypeptides inside the virus. It enables the production of a vector targeting a particular tissue. These proteins may be encoded by the virus genome itself, or supplied at the time of virus reconstitution through expression of genes other than virus genome (for example, genes derived from another expression vector or host cell chromosome).

The virus genes contained in the vector of the present invention may be altered, for example, to reduce antigenicity of the virus protein derived from the vector, or enhance RNA transcription efficiency or replication efficiency. Specifically, in the Paramyxovirus vector, it is possible to alter at least one of the NP, P/C, and L genes, which are genes of replication factors, to enhance transcription or replication. It is also possible to alter the HN protein, a structural protein having hemagglutinin activity and neuraminidase activity, to enhance the virus stability in blood by weakening the former activity and to regulate infectivity by altering the latter activity. It is also possible to alter the F protein, which is implicated in membrane fusion, to regulate its fusion ability of

the membrane-fused liposome. Furthermore, it is possible to analyze the antigen presenting epitopes and such of possible antigenic molecules on the cell surface, such as the F protein and HN protein, and use them to generate a Paramyxovirus vector that is engineered 5 to have weak ability to present these proteins as antigens.

Paramyxovirus vectors of the present invention may also lack accessory genes. For example, the disruption of the V gene, one of the accessory genes of SeV, results in reduction of pathogenicity of SeV toward hosts such as mouse without affecting gene expression 10 and replication in cultured cells (Kato, A. et al., J. Virol. 71:7266-7272 (1997); Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587 (1997); Curran, J. et.al., WO 01/04272, EP 1067179). Such attenuated vectors are particularly suitable as Paramyxovirus vectors of the present invention.

15 Recombinant Paramyxovirus vectors bearing exogenous genes , such as those encoding epitope-linked- β 2m or MHC class I heavy chain, can be obtained by inserting these genes into the above-described Paramyxovirus vector genome. The exogenous gene encoding the β 2m and the MHC class I heavy chain may be genes encoding naturally-occurring 20 proteins. Alternatively, these may be genes encoding modified proteins with deletion, substitution or insertion relative to the naturally-occurring protein so long as the modified protein is functionally equivalent to the naturally-occurring protein, so long as the modified protein has an ability to form an MHC class I/peptide 25 complex, or the formed complex is recognized by cytotoxic T cells or activates CTL. In the case of inserting an exogenous gene into virus vector DNA, such as Sendai virus vector DNA, a sequence comprising nucleotides of multiples of six is desirably inserted between the transcription end sequence (E) and the transcription start 30 sequence (S) (J. Virol., 67(8): 4822-4830 (1993)). An exogenous gene can be inserted upstream and/or downstream of each of the virus genes (NP, P, M, F, HN, and L genes). In order not to interfere with the expression of upstream and downstream genes, an E-I-S sequence 35 (transcription end sequence-intervening sequence-transcription start sequence) or a portion of it may be suitably placed upstream or downstream of an exogenous gene so that the unit of E-I-S sequence

is located between each gene. Alternatively, an exogenous gene can be inserted via IRES sequence.

Expression level of inserted exogenous genes can be regulated by the type of transcription start sequence that is attached to the upstream of the genes (WO 01/18223). It also can be regulated by the position of insertion and the sequence surrounding the gene. In the Sendai virus, for instance, the closer to the 3'-terminus of the negative strand RNA of the virus genome (the closer to NP gene in the gene arrangement on the wild-type virus genome) the insertion position is, the higher the expression level of the inserted gene will be. To achieve a high expression of an inserted gene, it is preferably inserted into the upstream region (3' flanking sequence of the negative strand genome) such as the upstream of the NP gene (3' flanking sequence on the negative strand), or between NP and P genes. Conversely, the closer to the 5'-terminus of the negative strand RNA (the closer to L gene in the gene arrangement on the wild-type virus genome) the insertion position is, the lower the expression level of the inserted gene will be. To reduce the expression of an exogenous gene, it may be inserted into the most 5' position on the negative strand, that is, downstream of the L gene in the wild-type virus genome (5' flanking region of the L gene on the negative strand) or upstream of the L gene (3' flanking region of L gene on the negative strand). Thus, the insertion position of an exogenous gene can be properly adjusted to obtain a desired expression level of the gene or optimize the combination of the insert with the virus genes surrounding it. For instance, if the overexpression of a transgene introduced by a high-titer virus vector may cause toxicity, it is possible not only to control the titer of viruses to be administered but also to reduce the expression level of individual virus vectors by designing the insertion position of the transgene closer to the 5'-terminus of the negative strand, or replacing the transcription start sequence with one having lower efficiency so as to obtain an appropriate expression level or therapeutic effect.

Generally, since high level expression of epitope-linked- β 2m is thought to be advantageous for efficient production of the protein and induction of immunity as long as it shows no cytotoxicity, it

is preferred to bind the gene encoding the epitope-linked- β 2m to a highly efficient transcription start sequence and insert it adjacent to the 3'-terminus of the negative strand genome. Preferred vectors include those wherein the gene encoding the epitope-linked- β 2m is placed in the 3' flanking region of all of the Paramyxovirus protein genes on the negative strand genome. For example, a vector in which the exogenous gene is inserted upstream of the N gene (in the 3' flanking region of the coding sequence of the N gene on the negative strand) is preferred. Alternatively, it may be inserted immediately downstream of the N gene.

To help the easy insertion of an exogenous gene, a cloning site may be designed at the position of insertion in the vector DNA encoding the genome. For example, the cloning site may be the recognition sequence of a restriction enzyme. The cloning site may be a multicloning site that contains recognition sequences for multiple restriction enzymes. The vector of the present invention may have other exogenous genes at positions other than that used for the insertion of the epitope-linked β 2m gene. Such exogenous gene may be, without limitation, a chemokine or cytokine gene, MHC class I heavy chain gene, or another gene.

Construction of a recombinant Sendai virus vector having an exogenous gene can be performed as follows, for example, according to the method described in Hasan, M.K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 (1997); Kato, A. et al., EMBO J. 16: 578-587 (1997); and Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466 (1997).

First, a DNA sample containing a cDNA nucleotide sequence encoding a desired exogenous gene is prepared. It is preferable that the concentration of the DNA sample is 25 ng/ μ l or higher and that it can be detected as a single plasmid by electrophoresis. The following description is an example where an exogenous gene is inserted into the *NotI* site of virus genomic DNA. When the target cDNA sequence contains a *NotI* recognition site, the site is desirably removed in advance by altering the nucleotide sequence using known methods, such as site-directed mutagenesis, while maintaining the encoded amino acid sequence. A desired DNA fragment is amplified by PCR from a DNA sample. In order to obtain a fragment having the *NotI* site at both

ends and to add a single copy of the transcription end sequence (E), intervening sequence (I); and transcription start sequence (S) of the Sendai virus (EIS sequence) to one end, synthesized DNA sequences (primer pair), namely, a pair of a forward primer (sense strand) 5 comprising a part of the desired gene, and a reverse primer (antisense) comprising a *NotI* recognition site, E, I, and S sequences, and part of the desired gene, is prepared.

For example, the forward synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus to ensure digestion with *NotI* 10 (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the *NotI* recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the sequence, the *NotI* recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, as a spacer, any 15 9 nucleotides or those of 9 plus multiples of 6 are added. Furthermore, to the 3'-terminus, a sequence of approximately 25 nucleotides corresponding to the ORF of the desired cDNA starting from the initiation codon ATG is added. The 3'-terminus of the forward synthetic oligo DNA containing approximately 25 nucleotides of the desired cDNA is preferably selected so that the last nucleotide is 20 G or C.

The reverse synthetic DNA sequence contains two or more nucleotides at the 5'-terminus (preferably 4 nucleotides not containing a sequence derived from the *NotI* recognition site, such as GCG and GCC; more preferably ACTT). To the 3'-terminus of the 25 sequence, the *NotI* recognition sequence GCGGCCGC is added. Furthermore, to the 3'-terminus, a spacer oligo DNA is added to adjust the length of the primer. The length of the oligo DNA is designed so that it is a multiple of 6 nucleotides including the *NotI* recognition sequence GCGGCCGC, the sequence complementary to the cDNA, and the 30 EIS sequence derived from the Sendai virus genome as described below (so-called "rule of six"; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72: 891-899 (1998); Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830 (1993)). Furthermore, to the 3'-terminus of the added sequence, complementary 35 sequences to the S sequence of the Sendai virus, preferably 5'-CTTCACCCCT-3' (SEQ ID NO: 1), sequence complementary to the I sequence, preferably 5'-AAG-3', and to the E sequence, preferably.

5'-TTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 2) are added. Finally, to the 3'-terminus, a sequence, which is selected so that the last nucleotide of the complementary sequence of the desired cDNA becomes G or C, is added, where the last nucleotide is approximately 25 nucleotides 5 upstream from the termination codon. Thus, the 3'-terminus of the reverse synthetic oligo DNA is prepared.

PCR can be performed by a common method using, for example, ExTaq polymerase (TaKaRa). Vent polymerase (NEB) may be used preferably, and the amplified fragment is digested with *NotI*, and 10 inserted into the *NotI* site of plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequence of the obtained PCR product is checked with automated DNA sequencer, and a plasmid having the correct sequence is selected. The insert is excised from the plasmid by *NotI* digestion, and subcloned into the *NotI* site of the plasmid comprising 15 Paramyxovirus genomic cDNA. Alternatively, the PCR products may be directly cloned into the *NotI* site of the virus genome cDNA without using a plasmid vector to obtain recombinant Sendai virus cDNA.

For example, recombinant Sendai virus genomic cDNA can be constructed according to the methods described in the literature (Yu, 20 D. et al., Genes Cells 2: 457-466 (1997); Hasan, M.K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 (1997)). For example, a 18-bp spacer sequence containing the *NotI* site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3'; SEQ ID NO: 3) is inserted into an adjacent gene locus of a cloned Sendai virus 25 genomic cDNA (pSeV(+)) between the leader sequence and the 5'-terminus of a sequence encoding the N protein, and the plasmid pSeV18⁺b(+) containing a self-cleavable ribozyme site derived from the antigenomic strand of the hepatitis delta virus is obtained (Hasan, M.K. et al., J. General Virol. 78: 2813-2820 (1997)). An exogenous gene fragment is inserted into the *NotI* site of pSeV18⁺b(+) to obtain 30 a recombinant Sendai virus cDNA into which a desired exogenous gene has been inserted.

A DNA encoding epitope-linked- β 2m is inserted into this vector. There is no limitation on the epitope used in the present invention, and a variety of desired epitopes having therapeutic effects against, 35 for example, tumors, infectious diseases, and other general diseases may be used. Generally, it is preferred to use a peptide of around

10 amino acids as the epitope, but the length of the peptide may be changed appropriately. The epitope-linked- β 2m may be, for example, a protein wherein the epitope is linked next to the secretion signal of β 2m and β 2m is linked to the epitope via a spacer sequence with 5 an appropriate length. Alternatively, the epitope sequence may be directly bound to β 2m without a spacer. The amino acid sequence of the spacer is not limited in any way, but preferred peptides used as the spacer include those comprising an amino acid sequence, for example, Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 13) or repeated sequences thereof, 10 (Gly-Gly-Gly-Ser)_n. The number of repetition (n) is not limited, however it is, for example, 1 to 5 (1, 2, 3, 4, or 5). When using a spacer, it preferably has a length of up to 16 amino acids, for example, 4, 8, or 16 amino acids.

The recombinant Paramyxovirus vector DNA prepared as described 15 above is bound to an appropriate transcription promoter and the resultant DNA is transcribed *in vitro* or intracellularly, and RNP is reconstituted in the presence of viral L, P, and NP proteins to produce a Paramyxovirus vector comprising the RNP. The present invention provides a method for producing a Paramyxovirus vector, 20 the method comprising the steps of transcribing DNA encoding the Paramyxovirus vector genome. The present invention also provides DNA for producing a Paramyxovirus vector for the present invention, wherein said DNA comprises the above-mentioned DNA. The present invention also relates to the use of DNA encoding the vector genome 25 for producing Paramyxovirus vectors of the present invention. Reconstitution of a virus from virus vector DNA can be performed according to known methods (WO 97/16539; WO 97/16538; Durbin, A.P. et al., Virol. 235: 323-332 (1997); Whelan, S.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392 (1995); Schnell, M.J. et al., EMBO J. 30 13: 4195-4203 (1994); Radecke, F. et al., EMBO J. 14: 5773-5784 (1995); Lawson, N.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481 (1995); Garcin, D. et al., EMBO J. 14: 6087-6094 (1995); Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579 (1996); Baron, M.D. and Barrett, T., J. Virology 35 71: 1265-1271 (1997); Bridgen, A. and Elliott, R.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404 (1996)). These methods enable the reconstitution of desirable Paramyxovirus vectors including the

parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus vectors and the other (-) strand RNA viral vectors from DNA. If the F, HN, and/or M genes are deleted from the virus vector DNA, infective virus particles will not be formed. However, it is possible to generate infective virus particles by introducing these deleted genes and/or genes encoding an envelope protein from another virus into the host cells and expressing them.

Paramyxovirus vectors are generally prepared by the steps of: (a) transcribing a vector DNA encoding a negative single-stranded RNA or its complementary strand (positive strand) derived from Paramyxovirus in cells (helper cells) expressing the NP, P, and L proteins; and (b) culturing the cells and recovering virus particles from the culture supernatants. The RNA transcribed from the vector DNA forms an RNP complex with the NP, L, and P proteins, leading to the generation of virus particles encapsulated in outer envelope containing envelope proteins.

The DNA encoding the virus genome (vector DNA) that is expressed in the helper cells encodes the minus strand (negative strand RNA) of the virus genome or its complementary strand (positive strand RNA). For example, the DNA encoding the negative single-stranded RNA or its complementary strand is bound downstream of T7 promoter and then transcribed to RNA with T7 RNA polymerase. Any desired promoter sequence may be used in place of a promoter that includes a sequence recognized by T7 RNA polymerase. Alternatively, an *in vitro* transcribed RNA may be transfected into helper cells. Although both positive and negative strands of the virus genome may be transcribed in the cell, it is preferred to let the positive strand transcribe to enhance the reconstitution efficiency.

Methods for introducing vector DNA into cells include (1) a method for forming DNA precipitates that can be incorporated into desired cells; (2) a method for making a complex that comprises positively charged DNA that is suitable for being incorporated into desired cells and that has low cytotoxicity; and (3) a method for instantaneously opening a pore large enough for DNA to pass through the desired plasma membrane using an electrical pulse.

A variety of transfection reagents can be used in (2), for instance, DOTMA (Boehringer), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, and DOSPER (Boehringer #1811169). For (1), transfection using calcium phosphate can be used. In this method, DNA incorporated by 5 cells is taken up into phagocytic vesicles, but it is known that a sufficient amount of DNA is also taken up into the nucleus (Graham, F.L. and van Der Eb, J., Virology 52: 456 (1973); Wigler, M. and Silverstein, S., Cell 11: 223 (1977)). Chen and Okayama studied the optimization of the transfer technology and reported (1) that maximal 10 efficiency is obtained when cells and precipitates are incubated under 2% to 4% CO₂ at 35°C for 15 hr to 24 hr; (2) that circular DNA has higher activity than linear DNA; and (3) that the optimal precipitates are formed when the DNA concentration in the mixed solution is 20 µg/ml to 30 µg/ml (Chen, C. and Okayama, H., Mol. Cell. Biol. 7: 2745 15 (1987)). The method of (2) is suitable for transient transfection. More classically, a transfection method in which DEAE-dextran (Sigma #D-9885 M. W. 5x 10⁵) is mixed with DNA at a desired concentration ratio is known. Because most complexes are degraded in the endosome, chloroquine may be added to enhance the transfection efficiency (Calos, 20 M.P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015 (1983)). The method of (3), called electroporation, may be more broadly applied than the methods of (1) and (2) because it can be used for any kind of cells. The transfection efficiency can be maximized by optimizing the duration of pulse currents, the form of pulse, the strength of the electrical 25 field (gap between electrodes, and voltage), conductivity of buffer, DNA concentration, and cell density.

Among the above three methods, the method of (2) is easy to perform and enables the testing of a large number of samples using a large amount of cells. Therefore, transfection reagents are 30 suitably used to introduce DNA into cells to reconstitute vectors. Preferable transfection reagents include, Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305) and DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169), but are not limited thereto.

35 Specifically, the reconstitution from cDNA can be performed as follows.

LLC-MK2, a cell line derived from a monkey kidney, is cultured on a plastic plate with around 24- to 6-wells, a 100-mm petri dish, or such, in minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotic (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to be 70% to 80% confluent. Cells are then infected, for instance, at 2 pfu/cell with recombinant vaccinia virus vTF7-3 that expresses T7 polymerase, which has been inactivated by a 20-minute UV exposure in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126 (1986); Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579 (1996)). The amount of psoralen and the duration of UV exposure can be optimized. One hour after infection, cells are transfected by, for example, lipofection using Superfect (QIAGEN) with 2 µg to 60 µg of, or more preferably 3 µg to 5 µg of the above recombinant Sendai virus cDNA together with expression plasmids for virus proteins (24-0.5 µg pGEM-N, 12-0.25 µg pGEM-P, and 24-0.5 µg pGEM-L, or more preferably 1 µg pGEM-N, 0.5 µg pGEM-P, and 1 µg pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579 (1996)) that function in trans and are required for producing a full-length Sendai virus genome. The transfected cells are cultured in serum-free MEM containing, if desired, 100 µg/ml rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) (Sigma), more preferably 40 µg/ml arabinoside alone; the drug concentration is adjusted to be optimal to minimize the cytotoxicity of the vaccinia virus and maximize the recovery of virus (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579 (1996)). Cells are cultured for 48 hr to 72 hr after transfection, then collected and lysed through three cycles of freeze-thawing. The cell lysates are transfected into LLC-MK2 cells and the cells are cultured. Alternatively, culture supernatants are recovered and added to the culture solution of LLC-MKK2 cells to infect the cells and then the cells are cultured. After a 3-day to 7-day culture, the culture medium is collected. Alternatively, the above-described freeze-thaw cell lysates are inoculated into the allanto of 10-day old developing chicken eggs, and three days later, allantoic fluid may be recovered. To reconstitute a virus vector lacking a gene encoding an envelope protein that is incapable of replication, the vector may be transfected into LLC-MK2 cells expressing an envelope protein, or co-transfected

with expression plasmid for the envelope protein. Alternatively, transfected cells can be overlaid and cultured on LLC-MK2 cells expressing envelope protein to propagate a deletion virus vector (see International Publication Numbers WO 00/70055 and WO 00/70070). The 5 virus titer of the culture supernatant or allantoic fluid can be determined by measuring hemagglutinin activity (HA). The HA may be determined by "end-point dilution" (Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579 (1996); Yonemitsu, Y. and Kaneda, Y., "Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells.", 10 Molecular Biology of Vascular Diseases. Methods in Molecular Medicine, Ed. by Baker A. H., Humana Press, 295-306 (1999)). To eliminate the possible contamination of vaccinia virus expressing T7 polymerase, the obtained allantoic fluid sample may be diluted appropriately (10^6 times for instance) and re-amplified in chicken 15 eggs. Re-amplification may be repeated, for example, three times or more. The obtained virus stock can be stored at -80°C.

Host cells for viral reconstitution are not limited to any special types of cells as long as the virus vector can be reconstituted in the cells. For example, in order to reconstitute a SeV vector and 20 the like, host cells including monkey kidney-derived cells such as LLC-MK2 cells and CV-1 cells, cultured cell lines such as BHK cells derived from a hamster kidney, and human-derived cells may be used. By expressing appropriate envelope proteins in these cells, infectious viral particles that include the proteins in its envelope 25 can be obtained. Furthermore, to obtain a large quantity of the Sendai virus vector, embryonated chicken eggs may be infected with virus vectors obtained from the above host cells and the vectors can be amplified. The method of producing virus vectors using chicken eggs has been established (Advanced protocols in neuroscience study III, 30 Molecular physiology in neuroscience., Ed. by Nakanishi et al., Kouseisha, Osaka, 153-172 (1993)). Specifically, for example, fertilized eggs are incubated for 9 days to 12 days at 37°C to 38°C in an incubator to grow the embryos. Virus vectors are inoculated into the allantoic cavity, and eggs are further incubated for several 35 days to propagate the vectors. Conditions such as the duration of incubation may vary depending on the type of recombinant Sendai virus

used. Then, the allantoic fluids containing viruses are recovered. Sendai virus vector is separated and purified from the allantoic fluid sample according to a standard method (Tashiro, M., "Protocols in virus experiments.", Ed. by Nagai and Ishihama, MEDICAL VIEW, 68-73 5 (1995)).

The construction and the preparation of Sendai virus vectors deficient in F protein can be performed, for example, as follows (see W000/70055 and W000/70070).

10 <1> Construction of F-deficient Sendai virus genome cDNA and F-expression plasmid

Full-length Sendai virus (SeV) genomic cDNA, pSeV18⁺b(+) (Hasan, M.K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 (1997)) ("pSeV18⁺b(+)" is also referred to as "pSeV18⁺"), is digested with 15 *Sph*I/*Kpn*I and the digested fragment (14673 bp) is recovered. The fragment is subcloned into pUC18 to obtain plasmid pUC18/KS. Construction of F gene-deficient region is performed using this pUC18/KS with a combination of PCR and ligation techniques. F 20 gene-deficient SeV genomic cDNA (pSeV18⁺/ΔF) is constructed by removing the F gene ORF (ATG-TGA= 1698 bp) and filling in the gap with, for example, atgcatgccggcagatga (SEQ ID NO: 4). PCR products obtained by primer pairs consisting of forward: 5'-gtttagtactgcaagagc (SEQ ID NO: 5) and reverse: 5'-tttgccggcatgcatgttcccaaggggagagtttgcaacc (SEQ ID NO: 6), and 25 primer pairs consisting of forward: 5'-atgcattgcggcagatga (SEQ ID NO: 7) and reverse: 5'-tgggtgaatgagagaatcagc (SEQ ID NO: 8) are linked at *Eco*T22I to the upstream and downstream of F gene, respectively. The thus-obtained plasmid is digested with *Sac*I and *Sal*I and the 30 fragment (4931 bp) which contains the F gene-deficient region is subcloned into pUC18 to give pUC18/dFSS. This pUC18/dFSS is digested with *Dra*III and the digested fragment is recovered. The fragment is replaced with an F gene-containing *Dra*III fragment of pSeV18⁺ to construct plasmid pSeV18⁺/ΔF.

An exogenous gene is inserted, for example, into the *Nsi*I and 35 *Ngo*MIV restriction enzyme sites in the F-deficient region of pUC18/dFSS. In order to clone exogenous genes into the region, for

example, exogenous gene fragments can be amplified using an *Nsi*I-tailed primer and an *Ngo*MIV-tailed primer.

<2> Construction of helper cells inducibly expressing SeV-F protein

For the construction of a plasmid expressing the SeV-F gene, Cre/loxP induced expression plasmid, plasmid pCALNdLw is constructed through the amplification of the SeV-F gene by PCR and the insertion of the amplified product into the unique *Swa*I site of plasmid pCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1998)), which is designed to express the gene product upon induction with Cre DNA recombinase.

A helper cell line, which expresses SeV-F protein, is established to recover infectious virus particles from the F gene-deficient genome. For example, LLC-MK2 cells, monkey kidney-derived cell line, which is often used for SeV propagation can be utilized. LLC-MK2 cells are cultured in MEM containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml Sodium Penicillin G and 50 µg/ml Streptomycin in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Since SeV-F gene products have cytotoxicity, the plasmid, pCALNdLw/F, which is designed to induce the expression of the F gene product by Cre DNA recombinase, is transferred into LLC-MK2 cells using the Calcium Phosphate method with Mammalian Transfection Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to protocols known to those skilled in the art.

Ten µg of plasmid pCALNdLw/F is transferred into LLC-MK2 cells which are propagated to 40% confluence in a 10-cm dish and then the cells are cultured in 10ml MEM medium containing 10% FBS in an incubator with an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C for 24 hours. Cells are scraped from the dish after 24 hours, suspended in 10 ml medium, and aliquoted to five 10-ml dishes so that, for example, 1 dish contains 5 ml, 2 dishes contain 2 ml, and 2 dishes contain 0.2 ml of cell suspension. Each cell is cultured in 10 ml MEM medium containing 1,200 µg/ml G418 (GIBCO-BRL) and 10% FBS for 14 days with a medium change every 2 days and stably-transfected cell lines are selected. G418 resistant cells, grown in the medium, are recovered using a cloning ring. Each recovered clone is propagated until it becomes confluent in a 10-cm dish.

The cells are cultured to confluence in 6-cm dishes and then infected with Adenovirus AxCANCre at m.o.i= 2 or 3 by the method by Saito et al. (Saito, et al., Nucl. Acids Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72(2): 1115-1121 (1998)) to induce expression of F protein in each clone.

5 <3> Reconstitution and amplification of F gene-deficient SeV

The above-described plasmid introduced with the exogenous gene of pSeV18⁺/ΔF is transfected into LLC-MK2 cells as follows. LLC-MK2 cells are seeded onto 100-mm petri dishes at a density of 5x 10⁶ cells/dish, incubated for 24 hours, and inoculated (m.o.i=2) (at m.o.i= 2 to 3, preferably 2) for 1 hour at room temperature with recombinant Vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126 (1986)) which has been treated with long wave UV (365 nm) and Solaren for 20 min. For UV exposure of the Vaccinia virus, for example, UV Stratalinker 2400 (Catalog No. 400676 (100 V), Stratagene, La Jolla, CA, USA) which is equipped with five 15-watt bulbs is used. Cells are washed three times and the plasmids pSeV18⁺/ΔF-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, and pGEM/L (Kato, A., et al., Genes Cells 1: 569-579 (1996)) are resuspended in OptiMEM (GIBCO) at ratios of 12 µg, 4 µg, 2 µg, and 4 µg/dish, respectively, and mixed with SuperFect transfection reagent (1 µg DNA / 5 µl of Superfect, QIAGEN). Mixtures are left standing at room temperature for 10 min and then added to 3 ml OptiMEM containing 3% FBS. The resulting mixture is added to the cells and incubated for 3 hours. The cells are then washed twice with serum-free MEM and incubated in MEM containing 40 µg/ml of cytosine β-D-Arabinofuranoside (AraC, Sigma) and 7.5 µg/ml trypsin (GIBCO) for 70 hours. These cells are harvested and the cell pellet is suspended in OptiMEM (10⁷ cells/ml). After 3 cycles of freeze-thawing, the cells are mixed with lipofectin reagent DOSPER (Boehlinger Mannheim) (10⁶ cells/25 µl DOSPER), and kept at room temperature for 15 min. LLC-MK2/F7 cells (10⁶ cells/well, 12-well plate), one of the F expressive helper cells cloned above, are transfected with the mixture, cultured in serum free MEM (containing 40 µg/ml AraC and 7.5 µg/ml trypsin), and then the culture supernatant is collected.

In preparing deletion virus vectors, two different virus vectors having deletion of a different envelope gene in the viral genome of the vector may be transfected into the same cell. In this case, each deleted envelope protein is supplied through expression 5 from the other vector, and this mutual complementation permits the generation of infective virus particles, which can replicate and propagate. Thus, two or more of the virus vectors of the present invention may be simultaneously inoculated in a combination that complement each other, thereby producing a mixture of each envelope 10 deletion virus vector at a low cost and in a large scale. Because these viruses lacking an envelope gene have a smaller genome, they can maintain a long exogenous gene more stably. In addition, it is difficult for these viruses, which are intrinsically non-infective, to keep the status of co-infection after being diluted outside cells, 15 and thus they are sterilized and less harmful to the environment.

Optionally, RNA-dependent RNA polymerase inhibitors may be administered after the administration of replicable Paramyxovirus vectors into individuals or cells to specifically arrest the propagation of the vectors without damaging the host. Such 20 administration of RNA-dependent RNA polymerase inhibitors may become necessary upon termination of treatment and such.

The collected Paramyxovirus may be purified to be substantially pure. The purification can be carried out by known purification/separation methods including filtration, centrifugation, and column 25 purification, or combinations thereof. The phrase "substantially pure" means that the virus is the major portion of a sample where it is present as a component. Typically, a sample can be confirmed to be a substantially pure virus vector when proteins derived from the virus vector occupies 10% or more, preferably 20% or more, more 30 preferably 50% or more, more preferably 70% or more, more preferably 80% or more, and even more preferably 90% or more, of the total proteins (but excluding proteins added as carriers or stabilizers) in the sample. Specific examples of purification methods for Paramyxovirus include methods using cellulose sulfate ester or cross-linked polysaccharide 35 sulfate ester (JP-B Sho 62-30752; JP-B Sho 62-33879; and JP-B Sho 62-30753), and those including adsorption of the virus with fucose

sulfuric acid-containing polysaccharide and/or its degradation product (WO 97/32010).

The mammalian cell-infecting virus vectors encoding epitope-linked- β 2m in an expressible manner express and secrete the epitope-linked- β 2m in mammalian cells upon introduction of the vectors into the mammalian cells. The present invention provides a method for producing an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of: (a) introducing a mammalian cell-infecting virus vector that encodes an epitope-linked- β 2m in an expressible manner into mammalian cells, and (b) recovering the epitope-linked- β 2m from the mammalian cells introduced with the vector or the culture supernatant thereof.

The epitope-linked- β 2m expressed in mammalian cells forms a heterodimer with an endogenous MHC molecule or an MHC molecule exogenously expressed in the cells. The heterodimers are recovered to obtain a protein complex containing the epitope-linked- β 2m. Specifically, this invention provides a method for producing an MHC class I/peptide complex containing the MHC class I heavy chain and epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of: (a) introducing a mammalian cell-infecting virus vector that encodes an epitope-linked- β 2m in an expressible manner into mammalian cells, and (b) recovering the formed MHC class I/peptide complex from the mammalian cells introduced with the vector or from the culture supernatant thereof. More preferably, to prepare the MHC class I/peptide complex, the MHC class I heavy chain is overexpressed exogenously in mammalian cells, and the heavy chain is then made to form the complex with the epitope-linked- β 2m. For example, a virus vector expressing the MHC class I heavy chain is introduced into the mammalian cells. There is no limitation on the virus vector, but preferably, Paramyxovirus vectors may be used. Alternatively, other virus vectors may be used. Moreover, mammalian cells wherein the vector is integrated into the chromosome, allowing constitutive or inducible expression of a desired MHC class I heavy chain, may be used. This enables intracellular overexpression of the desired MHC class I heavy chain to prepare the MHC class I/peptide complex. Alternatively, the MHC class I/peptide complex may be prepared through the binding of separately prepared epitope-linked- β 2m and MHC class

I heavy chain.

The MHC class I heavy chain may be expressed either as a membrane-bound form or a secretory form (or free form). Furthermore, the MHC class I heavy chain may be a wild-type protein or one with modified amino acid sequence. The secretory form MHC class I heavy chain may be prepared by expressing a protein with deleted membrane-binding region. Moreover, a desired peptide may be attached to the MHC class I heavy chain. For example, the addition of a biotinylation substrate peptide to the MHC class I heavy chain allows simple preparation of a tetramer of an obtained MHC class I/peptide complex using avidin via biotinylation of the expressed complex.

In the present invention, the phrase "biotinylation substrate peptide" refers to a peptide that serves as a substrate for biotinylation. There is no limitation on the biotinylation substrate.

For example, any peptide may be used as the biotinylation substrate as long as an -NH₂ group present on an amino acid residue is arranged in a state to allow chemical reaction. For example, a saccharide portion may be chemically modified by Biotin hydrazide (Assay Design, Co., Ltd.), a lysine-NH₂ may be modified by Biotin HNS, an -SH group may be modified by Biotin BMCC, and a -COOH group may be modified by 5-(Biotinamido)-Pentylamine EZ-Link. A preferred biotinylation substrate peptide includes peptides that allow enzymatic biotinylation. For example, a peptide serving as a substrate for a biotinylation enzyme (biotin ligase) that specifically adds one biotin to an amino acid (for example, lysine) is preferred. Such enzyme includes, for example, Bir A, a biotin ligase derived from *E.coli*. Bir A recognizes a peptide sequence of 13 amino acids and adds one biotin to a lysine at the center of the peptide. Several kinds of sequences are known to serve as a substrate for Bir A, and include, for example, LGGIFEAMKMELRD (SEQ ID NO: 31) (Schatz, P., Biotechnology 11: 1138-1143 (1993); Crawford, F., Immunity 8: 675-682 (1998)).

Such an MHC class I/peptide tetramer can be constructed according to methods comprising the steps of: (a) biotinyling an MHC class I heavy chain that contains a biotinylation substrate peptide, and (b) assembling the biotinylated MHC class I heavy chain in the presence

of avidin. Specifically, for example, a Bir A substrate peptide (BSP) sequence is attached to an MHC class I heavy chain, and then an MHC class I/peptide complex containing this MHC class I heavy chain is prepared. Then, the MHC class I heavy chain is biotinylated with Bir 5 A enzyme. After purification of the biotinylated MHC class I/peptide complex by such as FPLC, it may be multimerized through reacting it at a 1:1 ratio with the biotinylation site of streptavidin. Streptavidin may be appropriately labeled with R-phycocerythrin (R-PE), Cy 5, and such. The tetramerized MHC class I/peptide complex is 10 extremely useful for the detection and quantification of CTL (epitope-specific CD8-positive T cells) due to its enhanced CTL-binding ability. Cells bound to the MHC class I/peptide multimer can be detected by FACS and such.

Thus, the present invention relates to a method for detecting and 15 quantifying antigen-specific T lymphocytes utilizing a vector of the present invention, or epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complex expressed by the vector of the present invention. Furthermore, the present invention provides a detection agent for antigen-specific T lymphocytes comprising a vector of the present invention, or 20 epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complex produced by using the vector. Moreover, the present invention provides a use of the vectors of the present invention, or epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complex produced by using the vectors, for the detection of antigen-specific T lymphocytes.

25 For example, the MHC class I/peptide tetramer can be used for a simple and highly sensitive quantification of epitope-specific CD8-positive T cells. This method for detecting antigen-specific T lymphocytes using the tetramer comprises the steps of: (1) presenting the tetramer in a sample containing T lymphocytes, and (2) detecting cells bound 30 to the tetramer. It is possible to quantify the antigen-specific T lymphocytes by quantifying the cells bound to the tetramer.

To quantify epitope-specific CD8-positive T lymphocytes in individuals, for example, when the epitope is derived from HIV, a tetramer that displays the HIV epitope is added at an amount of 20 35 μ g/ml as the MHC class I/peptide complex to 1×10^6 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a HIV-infected patient, and incubated

at 37°C for 15 min and then at 4°C for 20 min. Herein, the optimal quantity of the tetramer and the optimal temperature vary depending on each tetramer, and thus are appropriately adjusted. Then, the cells are double-stained with anti-CD8-APC and analyzed by flow cytometry 5 to determine the frequency of tetramer-positive cells among total CD8-positive T cells. This method may be applied to cells isolated from various tissues such as lymph node, in addition to PBMC.

The cells stained with the tetramer according to the above procedure may be further stained with anti-PE-magnetic beads (Daiichi Pure 10 Chemicals) to isolate epitope-specific cells using a magnetic cell sorter (Daiichi Pure Chemicals). Thus, the tetramer of the present invention is also useful for the isolation of epitope-specific cells. Specifically, antigen-specific T lymphocytes can be isolated through the steps of: (1) presenting a tetramer of the present invention in 15 a sample containing T lymphocytes, and (2) separating cells bound to the tetramer.

Moreover, a vector of the present invention or epitope-linked- β 2m expressed by the vector may be used for *in vitro* CTL assay. Target cells for the CTL assay generally include cell lines 20 derived from the same individual as the CTL. For example, cells of Epstein-Barr virus-transformed B cell line (auto-lymphoblastoid cell line, auto-LCL) pulsed with a synthetic peptide may be used as the target cells. Alternatively, instead of using the synthetic peptide, epitope-linked- β 2m prepared by the vector of the present invention 25 may be added or the virus vector expressing the epitope-linked- β 2m may be infected into the auto-LCL. In fact, such auto-LCL was confirmed to have a cytotoxic activity. Cells of human cell lines can be used similarly through co-infection of virus vectors that express a desired MHC class I heavy chain (membrane-bound form) and 30 an epitope-linked- β 2m, which will be displayed on the MHC class I heavy chain, respectively.

Moreover, epitope-linked- β 2m may be used to establish epitope-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). Such epitope-specific CTL can be established via specific single or 35 multiple stimulations *in vitro*. For example, HIV Nef138-10-specific CTL can be established by arresting the growth of HIV-infected

individual's peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by irradiation, stimulating the PBMC with stimulator cells (derived from the same individual) pulsed with the HIV Nef138-10 peptide, and then co-culturing the cells in the presence of IL-2. Herein, culture supernatant of cells infected with a virus vector that expresses the epitope-linked- β 2m of the present invention (i.e., free form epitope-linked- β 2m protein) was demonstrated to be effective as synthetic peptides. Epitope-specific CTL may also be established by infection of a virus vector expressing the epitope-linked- β 2m to the stimulator cells.

Furthermore, the epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complexes (monomers or multimers) of the present invention can be used for a protein chip by binding them to a supporting-base of protein chips, for example, via a method other than utilizing biotin-avidin binding.

Human MHC class I molecules are preferably used as the MHC class I heavy chain when it is applied to humans, but not limited thereto. Human MHC class I molecules are called human leukocyte antigens (HLA) and are quite rich in variety. Any of these molecules can be used as the HLA in the present invention. For example, the present invention may be applied to any type of HLA whose desired epitope has been identified in infectious diseases and cancers, and they may be used as order-made or tailor-made reagents.

In particular, HLA-A24 (approximately 60 to 70%), HLA-A2 (approximately 40%), and HLA-A26 (approximately 20%) are high frequent HLA types in Japanese, followed by HLA-A11 (20%), HLA-A31 (up to 20%), and HLA-A33 (up to 20%). These HLA types are particularly preferred when applied to Japanese.

For the purpose of developing reagents or medicaments applicable to a certain extent of many unspecified individuals in, for example Japanese, HLA types having 5% or more allele frequency among Japanese population (namely, 10% or more HLA type frequency among Japanese) is preferred. Such HLA types include:

	A locus	B locus
35	A*0201	B*0702
	A*0206	B*1501

A*1101	B*3501
A*2601	B*4001
A*31012	B*4002
A*3303	B*44031
5	B*4601
	B*52011
	B*5401

10 In the Examples, the present inventors used A24-restricted HLA class I heavy chain as the MHC class I molecule and an HIV-1 derived epitope displayed on the A24-restricted HLA class I molecule as the epitope. Approximately 60 to 70% of the Japanese population have the genotype HLA-A*2402. Therefore, the A24-restricted HLA class I heavy chain, in particular, A*2402 (Litte, A.-M., Immunogenetics 35: 41-45 (1992)) is suitable in the present invention.

15 The epitope-linked-β2m and MHC class I/peptide complexes obtained according to the present invention may be used to induce antigen-specific cellular immune response. The present invention provides an agent to induce antigen-specific cellular immune response that comprises epitope-linked-β2m or MHC class I/peptide complex 20 obtained according to the present invention. Furthermore, the present invention relates to the use of the epitope-linked-β2m or the MHC class I/peptide complexes obtained according to the present invention to induce antigen-specific cellular immune response.

25 The inventors of the present invention constructed an epitope-linked-β2m derived from the HIV-1 Nef protein presented by HLA-A*2402 as an example using the SeV expression system, and verified that the epitope-linked-β2m binds as a secretory protein to the HLA-A*2402 molecules on the cell surface, resulting in an efficient antigen presentation to CTL. The epitope-linked-β2m produced by the 30 virus vectors of the present invention was suggested to be useful as a protein preparation. After purification and removal of virus contaminants from the epitope-linked-β2m, a clinically useful inducer of antigen-specific cellular immune response can be obtained. The present invention provides a pharmaceutical composition comprising 35 the epitope-linked-β2m or MHC class I/peptide complexes produced by the virus vectors of the present invention.

The method for inducing antigen-specific cellular immune response using epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complexes provided by the present invention specifically includes the step of contacting the epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complexes of the present invention with (epitope-specific) CD8-positive T cells.

For example, epitope-linked- β 2m of the present invention is useful for establishing *in vitro* epitope-specific CTL cell lines. Epitope-specific CTL cell lines can be established by one to several 10 rounds of specific stimulations *in vitro*. For example, to establish HIV Nef138-10-specific CTL cell lines, PBMC from HIV-infected individuals are irradiated to arrest their proliferation, stimulated with stimulator cells (derived from the same individual) pulsed with the HIV Nef138-10 peptide, and then co-cultured in the presence of 15 IL-2. Herein, synthetic peptides are generally used for the stimulation; however, a similar effect can be achieved by culture supernatants of cells infected with the epitope-linked- β 2m.

In addition, epitope-linked- β 2m of the present invention is useful to pulse target cells in CTL assays *in vitro*. Target cells 20 in the CTL assays may be pulsed with culture supernatants of cells infected with the epitope-linked β 2m, which gives the same result as with the synthetic peptide. Generally, a complex of an MHC class I heavy chain (membrane-bound form) + β 2m + peptide is already expressed on the cell surface. Thus, the pulsing with the synthetic peptide 25 is intended to exchange the synthetic peptide with the peptide portion of the complex. On the other hand, exchange of the β 2m and peptide portion of the complex is suggested to occur when pulsed with the epitope-linked- β 2m.

Epitope-linked- β 2m of the present invention is also useful to 30 pulse patient's dendritic cells *ex vivo*. Peripheral blood mononuclear cells are isolated from a patient and then differentiation to dendritic cells is induced by a standard method. These dendritic cells are pulsed with the epitope-linked- β 2m to subcutaneously administer them to the patient. As a result, the epitope-linked- β 2m 35 is expected to induce epitope-specific CTL due to its expression on the cell surface as a complex with an MHC class I heavy chain

(membrane-bound form) similarly as in the *in vivo* experiment. Since the dendritic cells pulsed with the epitope-linked- β 2m is expected to express the epitope on the MHC class I heavy chain (membrane-bound form) for a longer time than cells pulsed with a peptide, it may be 5 used as a "cellular vaccine (therapeutic vaccine)". Moreover, epitope-specific CTL may be induced by direct administration of the epitope-linked- β 2m of the present invention as a protein preparation.

Furthermore, mammalian cell-infecting virus vectors that encode epitope-linked- β 2m in an expressible manner themselves may be 10 used to induce antigen-specific cellular immune response. The present invention relates to inducers of antigen-specific cellular immune response comprising the mammalian cell-infecting virus vector that encodes the epitope-linked- β 2m in an expressible manner. Moreover, the present invention relates to the use of the mammalian 15 cell-inducing virus vector that encode the epitope-linked- β 2m in an expressible manner for the induction of antigen-specific cellular immune response. The virus vectors of the present invention are useful for gene therapy. The present invention provides pharmaceutical compositions comprising the mammalian cell-infecting virus vector 20 that encodes the epitope-linked- β 2m in an expressible manner. The virus vector is useful to induce antigen-specific immune response for infectious diseases, cancers, and such, due to its antigen-specific cellular immune response inducing ability. Applications of the virus vectors of the present invention to gene 25 therapy may be achieved through gene expression by either a direct (*in vivo*) administration or an indirect (*ex vivo*) administration of the virus vectors.

For example, in the process of *in vitro* establishment of epitope-specific CTL cell lines, stimulation of stimulator cells may 30 be achieved by infecting them with a virus vector that expresses epitope-linked- β 2m instead of using a synthetic peptide.

The virus vectors of the present invention may also be used to pulse target cells in an *in vitro* CTL assay. Auto-LCL cells infected with a virus vector expressing epitope-linked- β 2m instead of a 35 synthetic peptide may be used as target cells in the CTL assay. In fact, the cells were confirmed to have cytotoxic activity in the CTL

assay. In addition, to use human cell lines as target cells, they may be co-infected with a virus vector expressing a desired MHC class I heavy chain (membrane-bound form) and a virus vector that expresses an epitope-linked- β 2m presented by the MHC class I heavy chain.

5 Furthermore, the vectors of the present invention may be used for ex vivo gene transfer into patient's dendritic cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated from a patient and induced to differentiate into dendritic cells by a standard method. The dendritic cells are infected with a virus vector expressing
10 epitope-linked- β 2m, and then inoculated to the patient subcutaneously. The important point here is how long the expression of a pulsed peptide or the epitope-linked- β 2m protein continues on the surface of the pulsed dendritic cells. In fact, when the cells are pulsed with a synthetic peptide, the expression of the epitope on the cell surface
15 of the dendritic cells disappears in a short term. In contrast, a long time expression of the epitope-linked- β 2m can be achieved via the infection of the dendritic cells with the virus vector to allow intracellular expression of the epitope-linked- β 2m. Furthermore,
20 the vectors of the present invention are also useful for in vivo gene therapy wherein epitope-specific CTL is induced by in vivo administration of the vectors.

Target cells for gene transfer using the vectors preferably include those having antigen presenting ability. Such cells particularly include dendritic cells (DC). For example, a desired
25 MHC class I/peptide complex may be formed on dendritic cells by introducing a vector of the present invention into the dendritic cells ex vivo. The resulting cells may be used for the activation of antigen-specific T cells. The present invention relates to mammalian cells infected with a mammalian cell-infecting virus vector encoding
30 epitope-linked- β 2m of the present invention in an expressible manner. Desired isolated cells having antigen-presenting ability may be used as the mammalian cells. In particular, a large amount of MHC class I/peptide complexes may be formed by introducing an exogenous gene encoding an MHC class I heavy chain into the cells. The gene that
35 encodes the MHC class I heavy chain may be either encoded by an expression vector outside the chromosome or integrated into cellular

chromosome. A secretory form MHC class I/peptide complex can be produced in the cells by intracellularly expressing a secretory form MHC class I heavy chain. Such cells may be particularly useful for the production of the secretory form MHC class I/peptide complex.

5 When a membrane-bound form MHC class I heavy chain is intracellularly expressed, a membrane-bound MHC class I/peptide complex is expressed on the cell surface. Such cells have an excellent antigen-presenting ability to epitope-specific CTL. Furthermore, the present invention relates to cells presenting epitope-linked- β 2m produced by the method 10 of the present invention on the cell surface. Such cells can be prepared, for example, by adding the epitope-linked- β 2m produced by the method of the present invention to the cells. For example, dendritic cells may be prepared from a patient and induced *in vitro* to differentiated dendritic cells according to methods known to those 15 skilled in the art. The resultant cells are mixed with the epitope-linked- β 2m produced by the method of the present invention. This results in the formation of a complex of the epitope-linked- β 2m and MHC class I heavy chain on the cell surface of the dendritic cells derived from the patient. These cells also have the ability to present 20 antigens to epitope-specific CTL. The produced cells presenting the desired epitope may be put back into the patient's body to induce epitope-specific immune response. Namely, these cells can be used as vaccines. Thus, the epitope-linked- β 2m produced according to the method of the present invention is useful as a pharmaceutical to induce 25 antigen-specific immune response in patients. To produce cells that present epitope-linked- β 2m on the cell surface, the cells are pulsed with the epitope-linked- β 2m produced by the present method. Before the pulsing, pre-existing epitopes on the cells can be removed by acid treatment of the cells. The acid treatment can be carried out 30 through exposing the cells in an acidic environment so that the epitope peptides presented on the cell surface are significantly dissociated. The acid treatment may be carried out, for example, by treating the cells with a peptide-stripping buffer (0.13 M citric acid (pH 3), 66 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 17 mg/ml Phenol Red) at 4°C for 1 min, 35 followed by neutralization with enough culture medium (for example, RPMI). Those skilled in the art are able to perform the acid treatment

via other protocols achieving similar effect. The present invention provides pharmaceutical compositions comprising the above-described cell infected with the mammalian cell-infecting virus vector encoding epitope-linked- β 2m in an expressible, or the cell presenting the 5 epitope-linked- β 2m produced according to the method of the present invention.

In principle, since most of the somatic cells endogenously express the MHC class I, there is no need to exogenously express an MHC class I heavy chain in the production of above cells, but only 10 express or add epitope-linked- β 2m. A tailor-made medicine is realized through MHC typing of the patient and expression or addition of epitope-linked- β 2m selected in accordance with the MHC type. For example, when the patient has the A24-restricted MHC type, then the use of β 2m fused with an epitope presented by an A24-restricted T cell 15 is expected to produce a more significant effect in the therapy. It is preferred that the MHC type is identical in serotype or in genotype, and more preferably in genotype. Since approximately 70% of Japanese have the HLA-A*2402 genotype, it is possible to produce a medicine particularly suited for the application to Japanese through 20 identifying an epitope presented by cells having HLA-A*2402 and designing an epitope-linked- β 2m using the identified epitope. Furthermore, the most adapted therapeutic strategy for each patient can be determined through the analysis of epitopes corresponding to many kinds of MHC types.

25 The mammalian cell-infecting virus vectors, epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complexes obtained by the virus vectors, cells introduced with the vector, or cells having epitope-linked- β 2m on the cell surface of the present invention may be prepared as a composition in combination with, if necessary, desired 30 pharmaceutically acceptable carriers or vehicles. The phrase "pharmaceutically acceptable carriers or vehicles" refers to materials capable of being administered with the vectors, epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complexes, or the above-described cells of the present invention, and that do not 35 significantly interfere their activities. For example, a composition can be made by proper dilution of a mammalian cell-infecting virus

vector of the present invention, or an epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complex obtained by the vector with physiological saline or phosphate-buffered saline (PBS). When a Paramyxovirus vector has been propagated in chicken eggs, the composition may contain allantoic fluid. Moreover, the above cells may be suspended in physiological saline, PBS, or culture solution. In addition, the compositions of the present invention may contain carriers or vehicles such as deionized water and 5% dextrose solution. Furthermore, it may contain other materials including vegetable oils, suspending agents, detergents, stabilizers, and sterilizers. Moreover, preservatives and other additives may be used for the compositions. The compositions of the present invention are useful as reagents and medicines. The compositions are further useful as vaccines. The present invention also relates to the use of the vectors of the present invention, epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complexes obtained by the vectors, or the compositions comprising the above cells as reagents, medicines, or vaccines. To enhance immunogenicity, the vaccine compositions may contain immune accelerators including cytokines, cholera toxins, and salmonella toxins. Furthermore, the vaccines may be combined with adjuvants including alum, incomplete Freund's adjuvant, MF59 (oil emulsion), MTP-PE (muramyl tripeptide derived from *Mycobacterium* cell wall), and QS-21 (derived from soapbark tree *Quilaja saponaria*).

Moreover, cytokines can be effectively combined to enhance the adjuvant effect of the pharmaceutical compositions of the present invention for administration. Such combinations include: i) combination of IL-2 and single-stranded IL-12 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(15): 8591-8596 (1999)), ii) combination of IL-2 and interferon- γ (US Pat. No. 5,798,100), iii) GM-CSF alone, and iv) combination of GM-CSF and IL-4 for the treatment of brain tumors (J. Neurosurgery 90(6): 1115-1124 (1999)).

The vaccines of the present invention may be applied, for example, to tumors, infectious diseases, and other general diseases. For the treatment of infectious diseases, for example, epitopes of antigen proteins of infectious microorganism are analyzed, and then β 2m fused with the epitopes are produced. Antigen proteins include,

for example, envelope of virulent strain type H5N1 for influenza; for Japanese encephalitis, the envelope protein (Vaccine 17(15-16): 1869-1882 (1999)); HIV gag or SIV gag proteins (J. Immunology 164: 4968-4978 (2000)), HIV envelope proteins, the Nef protein and other virus proteins for AIDS; B subunit (CTB) of cholera toxin (Arakawa, T. et al., Nature Biotechnology, 16(10): 934-8 (1998); Arakawa, T. et al., Nature Biotechnology, 16(3): 292-7 (1998)) as an example of cholera antigens; glycoprotein of rabies virus (Lodmell, D.L. et al., Nature Medicine 4(8): 949-52 (1998)) as an example of rabies antigens; 5 and capsid protein L1 of human papilloma virus type 6 (J. Med. Virol 60: 200-204 (2000)) as an example of cervical cancer antigens. Furthermore, the present invention may be applied to pathogenic Paramyxovirus such as Measles virus and epidemic parotiditis virus that highly require the use of vaccines. Moreover, epitopes of antigen 10 proteins including JE-E antigen protein of Japanese encephalitis (JP-A Sho 64-74948, JP-A Hei 1-285498), gD2 protein of human herpes simplex virus (JP-A Hei 5-252965), hepatitis C virus-derived peptide (JP-A Hei 5-192160), and pseudorabies virus-derived polypeptide (Published Japanese Translation of International Publication No. 20 7-502173), may also be used. For example, cells from patients infected with these pathogenic microorganisms are analyzed to identify epitopes of the antigen proteins presented on antigen-presenting cells (APC). An epitope for the desired HLA type can be identified by selecting a proper HLA type.

25 It is clinically significant in treating tumor to develop diverse and new therapeutic strategies and methods, focusing on tumor-specific antigens. For example, in tumor therapy, an epitope-linked- β 2m may be expressed in antigen-presenting cells (APC), such as tumor cells or DC cells, using a vector of the present 30 invention, or protein products, such as epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complex, may be administered.

General means to develop a vaccine therapy includes the use 35 of DC cells known to have antigen-presenting ability to helper T cells (Th) as well as high antigen-presenting ability to CTL via MHC class I molecules (Mayordomo, J.I. et al., Nature Med. 1(12): 1279-1302 (1995)). As an example of tumor immunotherapy, studies to establish

a tumor vaccine therapy utilizing the MAGE antigen, which expression is confirmed in a variety of malignant tumors, as a target are in progress by Yasushi Fuji et al. (National Hospital Kyushu Cancer Center). The method was applied to 7 cases including 5 cases of recurrent gastric tumor and a case of recurrent esophagus tumor. As a result, shrink of metastatic lymph node, decrease in tumor markers, and improvement of clinical symptoms (hoaseness) were observed in the recurrent esophagus tumor case. In the gastric tumor cases, decrease in tumor markers in 4 of 6 cases was observed. No side effect was observed, suggesting safety of the tumor immunotherapy. Moreover, in many cases, improvement of clinical symptoms and decrease in tumor markers were observed, indicating the possibility that it serves as an effective therapeutic method through selection of the administration route, adaptable cases, and such. Clinical studies on the DC vaccine therapy using the MAGE-3 peptide have been practically started, and are suggested to be a safe and tumor-specific immunotherapy against progressive recurrent digestive organ cancer cases. However, for preventive administration of such vaccines to many patients, it is clearly troublesome and unpractical to find an optimal condition for administration of the dendritic cells as "natural adjuvant" to each patient. Therefore, efficient methods are desired in the art (Yamagishi, H. et al., Oral presentation in the General meeting of Japan society of Cancer Therapy: October 12 (1999), Gifu City). The application of the present invention to such a tumor vaccine therapy may be quite effective.

The prevention of tumorigenesis triggered by viruses may be achieved by preventing infection using a virus vaccine. Thus, virus-caused tumors can be more practically prevented compared with those caused due to other factors. For example, hepatitis C virus (HCV) associated with hepatic tumors; human papillomavirus (HPV) associated with uterine cancer, and HTLV-1 associated with adult T cell leukemia are candidates for vaccines aiming at prevention and therapy of infections. Hepatic tumors share a high ratio in Japanese tumors. Infection by hepatitis C virus occurs non-orally, and at high frequency gets chronic even in healthy adults with normal immunocompetence. Approximately 20% of the infected individuals are

predicted to suffer chronic hepatitis or cirrhosis. Moreover, many of the cirrhosis patients acquire liver cell cancer. While interferon treatment of hepatitis C made it possible to cure a part of the patients, its efficacy was not as initially expected and even now, there is no effective therapy for more than half of the patients. Generally, viral infections are prevented by inducing neutralizing antibodies via vaccination. However, hepatitis C virus is susceptible to mutation and the existence of a neutralizing antibody that interrupts its infection has not been proven so far. Virus infections are known to be protected by inducing CTL in addition to the induction of neutralizing antibodies. The administration of the vectors of the present invention is expected to induce activation of CTL in such virus infections.

Moriyama, T. et al. (Jichi Medical School) have been studying methods using genes themselves that encode pathogenic antigens as vaccines (DNA vaccines) as a novel method to induce CTL. The method has problems such as insufficient expression and the administration site being limited to the muscles as described in their articles (Kurane, I. "DNA vaccine, present situation and new findings", Current Concepts in Infectious Diseases 19(3): 6-9 (2000)). Another article describes a cancer vaccine utilizing HER2, a membrane type glycoprotein having tyrosine kinase activity, that is found overexpressed in breast cancers (Kageyama, S., Watanabe, M., Hiasa, A., and Suku, K., "Cancer and immunity, cancer-specific immune therapy, vaccine therapy against breast cancer using a HER-derived peptide", New Horizon for Medicine 32(5): 1167-1172 (2000)). The virus vectors provided by the present invention is expected to exert higher effect than these DNA vaccines. Highly efficient vaccines may be provided according to the present invention by constructing vectors using virus vectors that have a wide expression range among mammal tissues (adenovirus vectors, adeno-associated virus vectors, herpes simplex virus vectors, retrovirus vectors, Lentivirus vectors, Semliki forest virus vectors, Sindbis virus vectors, vaccinia virus vectors, Sendai virus vectors, etc.).

Although uterus cancer is a female-specific tumor, the significance to develope vaccines for the prevention and therapy of

HPV infection is the same as other tumors. The main infection route of HTLV-1 is mother-to-child transmission. However, there are also other routes. Although the pathogenicity of recently discovered HGV is unclear, it is widespread in society like HCV, indicating the need 5 to prevent such virus at the perspective of public health. Thus, such virus is also a target for the application of the present invention.

Investigations concerning applications of antigen-presenting cells and the route of administration are also important. The most extensively studied route of administration for vaccine therapy 10 comprises the steps of: (1) isolating the small amount of DC cells contained in the peripheral blood of a patient; (2) culturing and amplifying them *in vitro*; and (3) returning them into the patient's body via intravenous injection. This method utilizes the ability of DC cells to present antigens via MHC class I molecules to CTL. This 15 system requires respectable facilities and time for culture.

Recently, vaccine therapy utilizes skin is featured. The investigations of anti-virus vaccine therapy and cancer vaccine therapy utilizing dendritic cells including Langerhans cells (LC) that were recently found to efficiently present endogenous antigens, 20 such as virus antigens and cancer antigens, to CTL via MHC class I molecules on the cell surface are attracting attention. Since many LC cells are on the epidermis of skin, efficient DNA vaccine therapy may be developed by applying virus peptides or genes encoding antigens on the skin. However, LC cells in normal skin are in the dormant state, 25 and have low antigen presenting activity to Th and CTL, as well as poor mobility into the lymph node. Therefore, it is difficult to realize a virus vaccine therapy or cancer vaccine therapy using normal skin. To solve these problems, Naohiro Seo and Masahiro Takigawa (Hamamatsu Univ. School of Medicine) along with colleagues 30 demonstrated that LC cells on the skin become activated, then move into the lymph node and efficiently present antigens to Th cells by disrupting the most external skin layer, the corneum barrier, through 8 to 15 times repeated tape stripping (TS) (Japanese Patent Application No. Hei 10-316585, "Percutaneous peptide immunization via corneum 35 barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis"; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 371-376 (2000)).

This method expands the possibility of virus vaccines and cancer therapy due to its potential to enable application of virus peptides, cancer peptides or antigen DNAs to the barrier-disrupted skin. These administration methods can be applied to the present invention.

5 To accomplish more confident clinical applications, it is important to construct human HLA-restricted cancer-specific CTL cell lines, and clone genes encoding cancer-reactive CTL-inducing antigens recognized by the cell lines to develop target molecules for clinically applicable tumor-specific immunotherapy against cancer patients.

10 Immune response is expected to be induced more efficiently by identifying an epitope presented by an HLA of the same type as that of a patient, and producing a vector or peptide vaccine of the present invention using the identified epitope.

Cancers that frequently occur in Japanese include, for example,
15 lung cancer, digestive tract cancer (esophagus, stomach, and colon cancers), liver cancer, head and neck cancer, breast cancer, uterine cancer, oophoroma, nephroma, and leukemia. Among these cancers, it is clinically useful to choose the tissue type of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma as therapeutic targets, because they
20 share most of these cancers in Japanese. Epidermal cancers share not only the majority of adult malignant tumors in Japanese, but also occur most frequently in the world. Therefore, epitopes of epidermal cancer cell-specific antigens are suitably used in the present invention. Moreover, as for HLA, the identification of HLA-A24
25 (approximately 60% of cancer patients), HLA-A2 (approximately 40%), and HLA-A26 (approximately 20%)-restricted CTL-recognized cancer-regressive antigens are particularly important, since these HLA types are also dominant in Japan. Following these types,
30 identification of antigens intended to HLA-A11 (20%), HLA-A31 (up to 20%), and HLA-33 (up to 20%) are also important. Ninety five percent or more Japanese possess at least any one of HLA-A24, -A2, -A26, -A31, and -A33. Furthermore, these HLA alleles are distributed widely beyond the ethnic difference. Therefore, it is preferred to identify genes encoding cancer-reactive CTL-inducing antigens from cells
35 having these HLA types, and apply them to the present invention.

Kyogo Ito (Medical school of Kurume Univ.) et al. have

established many specific killer T cells against human HLA class-restricted epidermal cancers (adenocarcinoma and squamous cell carcinoma) which frequently occur among Japanese, and cloned genes encoding antigens recognized by the cells and that have the ability 5 to induce epidermal cancer-reactive CTL. Furthermore, they identified cancer antigen peptides encoded by the genes, and have been analyzing their *in vitro* killer T cell-inducing abilities (Tou, U., Yamana, H., Sueyoshi, S., Shintani, F., Tanaka, T., Kubota, M., Mine, T., Sasahara, H., and Ito, K., "Cloning and analysis of an antigen 10 gene from the peripheral blood lymphocytes after the specific adoptive immunotherapy by a local injection of CTL from a patient carrying esophagus cancer", The Japanese Society of Gastroenterological Surgery 33(7): 1191 (2000)). Hitherto, 4 genes (SART-1 to SART-4) and 3 genes from squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cDNA 15 libraries, respectively, were cloned and their coding proteins were analyzed. Selective apoptosis was induced in cancer cells introduced with the SART-1 gene. In addition, the HLA-A24-restricted peptide (SART-1 690-698) strongly induced CTL, and the HLA-A26-restricted peptide (SART-1 736-744) induced CTL in cancer patients with HLA-A2601, 20 -A2602, or -A2603 (Yamana, H. and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), "Antigen peptide therapy of tumors; cancer immunotherapy using the SART-1 antigen peptide", Journal of Clinical and Experimental Medicine 190(2): 129-133 (1999); Inoue, K. (Research Institute of National Cancer Center), Nakao, M., Matsunaga, K., 25 Matsuoka-kikuchi, S., Yamana, H., and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), "Induction of CTL in peripheral blood lymphocytes from HLA-A26-positive healthy subjects and cancer patients with different HLA subtypes, using the SART-1 peptide", General meeting abstracts of Japanese Cancer Association). Furthermore, the 140 kD 30 SART-3-reactive cancer-reactive CTL-inducing antigen was found to selectively express in proliferating cells and also in the nucleus of cancer cells, and two nonapeptides that have CTL-inducing ability to the lymphocytes of HLA-A24-positive cancer patients were identified within the antigen (Yamana, H., Sasatomi, T., Miyagi, Y., 35 Tou, U., Shiromizu, K., and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), Japan Surgical Society (supplement) 101: 417 (2000)). In the interest

of the expression of these cancer-reactive CTL-inducing antigens at the protein level in various cancers, the SART-1 antigen was expressed in 60 to 80% of squamous cell carcinomas and in 40 to 50% of adenocarcinomas except for breast cancer; SART-2 in more than 60% of squamous cell carcinomas; and SART-3 in most malignant tumors including adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. In contrast, these antigens are not expressed in normal tissues except the testicle (Ito, K., Shichijo, S., and Yamana, H. (Medical School of Kurume Univ.), "Tumor immunity 9, Human cancer-specific T cell-recognized antigen 10 2, Squamous cell carcinoma-reactive CTL-inducing antigen SART-1 and peptide vaccines", Immunology Frontier 9(3): 195-204 (1999)). HLA-A26 and HLA-A*2402 are shared in 22% and approximately 60%, respectively, in Japanese. Therefore, these peptide vaccines are expected to be applicable to many squamous cell carcinoma patients 15 in Japan. Phase 1 clinical studies using the above peptides are being planned in Kurume Univ. (Yamana, H. and Ito, K. (Medical School of Kurume Univ.), "An explanation of guideline to clinical studies", A proposal regarding the first clinical studies on tumor peptide vaccines, Cellular Molecular Medicine 1(1): 89-95 (2000)). The 20 application of the present invention may be useful for epitopes derived from these antigen peptides.

An effective immunotherapy can be conducted by applying genes encoding the above-described peptide antigens to the present invention. Apart from these antigens, epitopes include the cancer 25 antigen Muc-1 and the Muc-1-like mucin tandem repeat peptide (US Pat. No. 5,744,144), and the melanoma gp100 antigen. Immunotherapy using these genes has been applied to a variety of cancers including breast cancers, colorectal cancers, pancreatic cancers, prostate cancers, lung cancer, etc. In addition, the gene encoding the above-mentioned 30 tumor antigen peptide HER2 was found to be overexpressed or amplified in about 20 to 40% of cases of breast cancers, oophoromas, stomach cancers, and non-small cell pulmonary carcinomas, indicating high tendency of tumor specificity. Two nonapeptides (HER2p63-71 and HER2p780-788) originating from HER 2, which peptides are derived from 35 dendritic cells purified from peripheral blood mononuclear cells of oophoroma patients and normal healthy subjects are exemplified as

epitopes of the present invention (Eur. J. Immunol. 30: 3338-3346 (2000)). Moreover, the vectors or peptides of the present invention may be applied to cancer vaccine therapy for CEA-positive progressive solid tumors using CEA epitope peptides (Kim, C. et al., Cancer Immunol. 5 Immunother. 47: W 90-96 (1998)). For example, large amounts of peripheral blood mononuclear cells may be isolated from a patient by selected collection of blood components, dendritic cells are induced by the addition of IL-4 and GM-CSF from the mononuclear cell fraction, induced dendritic cells are then introduced with CEA epitope 10 peptide produced by the vector of the present invention or the vector itself, and finally the dendritic cells are subcutaneously administered as "DC vaccine" (Okamoto, K., Shirokazu, T., Sakakura, C., Otsuji, E., Kitamura, K., and Yamagishi, K. (Kyoto Prefectural University of Medicine), "A case of bone metastatic lung cancer wherein 15 dissociation between serum CEA values and anti-tumor effect was achieved via CEA-specific active immunotherapy", International Association of Surgeons and Gastroenterologists).

Optionally, the present invention may be applied to general diseases. In the interest of diabetes, for example, an insulin 20 fragment peptide may be used as an epitope to type I diabetes animal model (Coon, B. et al., J. Clin. Invest. 104(2): 189-194 (1999)).

Compositions comprising a vector of the present invention, or an epitope-linked- β 2m or MHC class I/ peptide complex obtained by the vector, may be administered at a quantity sufficient to at least 25 partially induce antigen-specific cellular immune response. However, the administration dose of the protein or expression level of the gene should be determined by considering its effective level and intoxication level. The route of administration may be appropriately selected from, for example, percutaneous, pernasal, perbronchial, 30 intramuscular, intraperitoneal, intravenous, intraarticular, and subcutaneous administrations, but is not limited thereto. They may be administered local or systemically. The induction of cellular immunity can be detected by such as CTL assay as described in the present invention.

35 The expression levels of genes introduced into cells using a vector of the present invention may be assayed by methods known to

those skilled in the art. Transcription products from the genes may be detected and/or quantified by, for example, Northern hybridization, RT-PCR, or RNA protection assay. The detection by Northern hybridization and RNA protection assay can be also performed *in situ*.
5 Western blotting, immunoprecipitation, RIA, ELISA, Pull-down assay, and such, using antibodies may be conducted for the detection of translation products. Moreover, for easier detection of expression products, tags may be attached to proteins to be expressed or reporter genes may be inserted so that they are expressed. Examples of the
10 reporter genes include β -galactosidase, CAT, alkaline phosphatase, and GFP proteins; however, they are not limited thereto.

The dose of the epitope-linked- β 2m or MHC class I/peptide complexes may vary depending on the disease, body weight, age, sex, and symptom of the patient, the purpose of administration, the type
15 of the administered composition, the route of administration, and such, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. The dose may be, for example, within the range of 10 ng/kg to 100 μ g/kg, preferably 100 ng/kg to 50 μ g/kg, and more preferably 1 μ g/kg to 5 μ g/kg. When a combination of multiple epitopes are used
20 for administration, each of the epitopes may be administered at the above dose. The Epitope-linked- β 2m or the MHC class I/peptide complexes may be properly combined with pharmaceutically acceptable carriers.

The dose of the vectors may vary depending on the disease, body
25 weight, age, sex, symptom, purpose of administration, transgene, and such, but it can be appropriately determined by those skilled in the art. A Paramyxovirus vector is preferably administered at a titer within the range of about 10^5 pfu/ml to about 10^{11} pfu/ml, more preferably about 10^7 pfu/ml to about 10^9 pfu/ml, and most preferably
30 about 1×10^8 pfu/ml to about 5×10^8 pfu/ml, within a pharmaceutically acceptable carrier. The dose is preferably about 10^5 pfu/round to 10^{11} pfu/round, more preferably about 10^7 pfu/round to 10^9 pfu/round, and most preferably about 10^8 pfu/round to 10^9 pfu/round.

The compositions of the present invention comprising virus may
35 be administered to all mammalian animals including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, and dogs.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the structure of the SeV vector (*e*/ β 2m/SeVb) that expresses epitope-linked- β 2m (*e*/ β 2m).

5 Fig.2 shows the structure of the SeV vector that expresses the membrane-bound and secretory forms HLA-A*2402 molecules. A biotinylation substrate peptide (Bir A substrate peptide) is attached to the secretory form HLA-A*2402 molecules.

10 Fig.3 shows the structure of the SeV vector that expresses the membrane-bound form HLA-A*2402.

Fig.4 is a graph showing the result of detection of MHC class I/peptide complex recovered from cells co-infected with SeV vectors expressing the epitope-linked- β 2m and secretory form HLA-A*2402. CV-1 cells were co-infected with A24-BSPHis/SeVb and *e*/ β 2m/SeVb at m.o.i 10 and 2, respectively. Three days later, 100 μ l of the culture supernatant was collected to detect the MHC class I/peptide complex by ELISA. As negative controls, cells infected with β 2m/SeVb and wt/SeV (wild-type SeV without an exogenous gene) instead of *e*/ β 2m/SeVb were used.

20 Fig.5 depicts a graph and a photograph showing the purification of the secretory form MHC class I/peptide complex. CV-1 cells were co-infected with A24-BSPHis/SeVb and *e*/ β 2m/SeVb at m.o.i 10 and 2, respectively. Three days later, 100 ml of the culture supernatant was collected and fractionated by FPLC using anti-His tag antibody. 25 A portion of each fraction was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting to quantify the protein concentration. About 1 mg of the secretory form MHC class I/peptide complex was recovered.

Fig.6 is a graph showing the effect of the membrane-expressed form MHC class I/peptide complex. H9 cells (human T cell line, 30 HLA-A*2402-) were infected with A24full/SeVb and *e*/Nef138- β 2m/SeVb at m.o.i 10 and 2, respectively. As a negative control, cells infected with wt/SeVb instead of *e*/Nef138- β 2m/SeVb was used. Eighteen hours later, the cells were labeled with 100 μ Ci of $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ for 2 hours to perform ^{51}Cr release assay using Nef-138-10-specific CTL clone.

35 Fig.7 shows the effect of the secretory form epitope-linked- β 2m. H9 cells (HLA-A*2402-, human T cell line) were

co-infected with e/Nef138- β 2m/SeVb or as a control with wt/SeV at m.o.i 2. Three days later, the culture supernatant was recovered and filtered using 0.22- μ m membrane filter.

As target cells, H9 cells (HLA-A*2402-, human T cell line) 5 were co-infected with A24full/SeVb and wt/SeV at m.o.i 10 and 2, respectively. Eighteen hours after the infection, the target cells were labeled with 100 μ Ci of Na₂⁵¹CrO₄ for 2 hours. Then, the cells were pulsed with either the culture supernatant containing the e/Nef138- β 2m prepared as described above, 10 μ M of Nef138-10 synthetic 10 peptide as a positive control, or the culture supernatant of the wt/SeV-infected cells as a negative control. After an hour, cells were subjected to ⁵¹Cr release assay using Nef138-10-specific CTL clone. As a comparison, H9 cells co-infected with A24full/SeVb and e/Nef138- β 2m/SeVb at m.o.i 10 and 2, respectively, were assayed 15 similarly.

Fig.8 depicts photographs showing the detection of epitope-specific CD8-positive T cells with MHC class I/peptide tetramer. 20 μ g/ml of RPE-labeled A24/Nef 138-10 tetramer, an MHC class I/peptide tetramer, was added to 1x 10⁶ of peripheral blood 20 mononuclear cells (PBMC) from HIV-infected subject and normal healthy subject (both HLA-A*2402-positive), and incubated at 37°C for 15 min. The cells were washed once, APC-labeled anti-CD8 was added thereto and reacted at 4°C for 20 min. The cells were washed three times and fixed with PBS (phosphate-buffered saline) containing 1% 25 paraformaldehyde. PBS containing 2% fetal calf serum and 0.1% sodium azide were used for staining and washing. A fraction containing 1x 10⁵ lymphocytes was expanded against A24/Nef138-10 tetramer and anti-CD8 antibody. The numbers in the graph indicate the percentage (%) of tetramer positive cells among CD8-positive T lymphocytes.

30

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is specifically illustrated below with reference to the Examples, but is not to be construed as being limited thereto. Furthermore, all references cited throughout this 35 specification are incorporated by reference.

[Example 1] Isolation of HLA-A*2402 gene and human β2m gene

The HLA-A*2402 gene, one of the human MHC class I gene, and the human β2m gene were cloned from messenger RNAs (mRNA) of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a normal healthy subject carrying the HLA-A24. Micro-FastTrack Kit (Invitrogen) was used for the separation of mRNA and AMV-RT First-strand cDNA synthesis kit (LIFE SCIENCE) was used for the synthesis of cDNA.

Using the obtained cDNA as a template PCR was conducted using primer sets HLA-5P2 and HLA-3B, and b2m-5' and b2m-3' for the HLA-A*2402 and β2m genes, respectively.

HLA-5P2, 5'-GGGCGGATCCGGACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG-3' (SEQ ID NO: 9)

HLA-3B, 5'-CCGCCTCGAGCTGGGAGGAAACAGGTCAGCATGGAAC-3' (SEQ ID NO: 10)

b2m-5', 5'-GGCACGAGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGC-3' (SEQ ID NO: 11)

b2m-3', 5'-AATTGGAATTCATCCAATCCAAATGCGGC-3' (SEQ ID NO: 12)

PCR was carried out by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, followed by extension reaction at 72° for 7 min. PCR was carried out using Ex Taq (TaKaRa). PCR products thus obtained were cloned using pGEM-T vector system (Promega) (dubbed A*2402/pGEM and β2m/pGEM, respectively), and their nucleotide sequences were confirmed by sequence reactions. The sequence reactions were carried out using dye terminator chemistry (Big-Dye terminator cycle sequencing Ready Reaction Kit; Applied Biosystems) by electrophoresis on AB1-377 DNA Sequencer.

[Example 2] Construction of epitope-linked- β2m expression vector

Following steps were performed to construct plasmid (e/β2m/pSeVb) that encodes a SeV vector expressing an epitope-linked- β2m. The insertion of the sequence for each epitope and linkers downstream of the β2m signal sequence, and the attachment of E and S signals of Sendai virus and NotI recognition site were performed by PCR (Fig.1). The amino acid sequence of the linker (GGGSGGGSGGGS/SEQ ID NO: 14) was designed to have 3 repeated sequences of GGGS (SEQ ID NO: 13). Primers used were as follows:

e/b2m-a1,

5'

-GGAGGTGGCGGGTCCGGAGGTGGTTCTGGTGGAGGTCGATCCAGCGTACTCCAAAGATT-3'
 (SEQ ID NO: 15)
 e(Nef)-a2, 5'
 -TCTGGCCTGGAGGCTAGATATCCACTGACCTTGGATGGTGCTCGGAGGAGGTGGCGGGTCC
 5 -3' (SEQ ID NO: 16)
 e(Env)-a2, 5'
 -TCTGGCCTGGAGGCTAGATAACCTAACGGATCAACAGCTCCTAGGGATTGGAGGAGGTGGCGGGTCC
 -3' (SEQ ID NO: 17)
 e/b2m-a3, 5'
 10 -TGCGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCT
 CTTTCTGGCCTGGAGGCT-3' (SEQ ID NO: 18)
 b2m-d, 5'
 -TTGCGGCCGCGATGAACTTCACCTAACGTTTCTTACTACGGCGTACGTTACATGTCTCGA
 TCCCACCT-3' (SEQ ID NO: 19)

15 PCR was carried out using β 2m/pGEM as a template and a set of primers, e/b2m-a1 and e/b2m-d, by 15 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, followed by an extension reaction at 72°C for 7 min. The obtained PCR product was used as a template for further PCR using e(Nef)-a2 or e(Env)-a2 and b2m-d under the same
 20 conditions, followed by another PCR using these products as a templates and e/b2m-a3 and b2m-d under the same conditions to obtain e/Nef138- β 2m and e/Env584- β 2m fragments. Each of these fragments was cloned using pGEM-T vector system (Promega) and their sequences were confirmed by sequence reactions. Then, each vector containing either of the
 25 fragments was digested with NotI and inserted into the NotI-digested site of pSeV18⁺b(+), and the nucleotide sequences were confirmed again. Thus, e/Nef138- β 2m/pSeVb and e/Env584- β 2m/pSeVb were obtained (generically dubbed as "e/ β 2m/pSeVb"). On the other hand, Sendai virus β 2m/pSeVb expressing native β 2m alone was also constructed
 30 similarly as described above, using b2m-a (5'-TGCAGGCCGCCGTACGGCCGAGATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA-3' (SEQ ID NO: 20) and b2m-d. The amino acid sequences of the Nef epitope (Nef138-10) and the Env epitope (Env584-11) are shown in SEQ ID NOs: 24 and 26, respectively.

35

[Example 3] Construction of vector expressing secretory form MHC class

I heavy chain added with biotinylation substrate peptide

PCR was used for the attachment of Bir A substrate peptide (BSP) sequence (SEQ ID NO: 31), histidine tag (his), E and S signals of Sendai virus, and Not I site to the extracellular domain of HLA-A*2402 gene (Fig.2).

Primers used were as follows:

A24-a, 5'-TGCAGGCCGTACGAGGATGGCCGTATGGCGCCCCG-3' (SEQ ID NO: 32)

A24-d1,

5'-GTCCCGCAGCTCCATCTTCATTGCCTCAAAGATTCCCTCCAAGGGATCCCCATCTCAGGGTG

10 AGGGGCTT-3' (SEQ ID NO: 33)

A24-d1/his,

5'-CTACGGCGTACGTCAATGGTGGTGATGGTGGTGGTCCCAGCTCCAT-3' (SEQ ID NO:

34)

A24-d2/his,

15 5'-TTGCGGCCCGCATGAACCTTCACCCTAACGTTTCTTACTACGGCGTACGTCA-3' (SEQ ID NO: 35)

PCR was carried out using A*2402/pGEM as a template and a set of primers A24-a and A24-d1, by 15 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min followed by an extension reaction at

20 72°C for 7 min. The PCR product was used as a template for further PCR using A24-a and A24-d1/his under the same conditions, followed by another PCR using this PCR product as a template, A24-a and A24d2/his as primers under the same conditions to obtain A24-BSPhis fragment. A24-BSPhis/pSeVb was obtained similarly as for the generation of

25 e/β2m/pSeVb.

[Example 4] Construction of vector expressing membrane-bound form MHC class I heavy chain

The addition of E and S signals of Sendai virus and NotI site 30 were performed by PCR (Figs. 2 and 3).

Primers used were as follows:

A24-a#, 5'-TGCAGGCCGTACGCCGAGGATGGCCGTATGGCGCCCCG-3' (SEQ ID NO: 40)

A24-d4,

35 5'-TTGCGGCCCGCATGAACCTTCACCCTAACGTTTCTTACTACGGCGTACGTACACTTAC AAGCTGTGAG-3' (SEQ ID NO: 41)

PCR was carried out using A*2402/pGEM as a template and a set of primers A24-a# and A24-d4 by 15 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72° for 1 min, followed by an extension reaction at 72°C for 7 min, yielding A24full fragment. A24full/pSeVb was obtained 5 similarly to the generation of e/β2m/pSeVb.

25 [Example 5] Reconstitution and infection of Sendai virus vector

pSeV18⁺b(+), pGEM-L, pGEM-P, pGEM-N, and vTF7-3 have been described previously (Hasan, M.K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820 10 (1997); Kato, A. et al., EMBO. J. 16: 578-587 (1997); Yu, D. et al., Genes Cells, 2: 457-466 (1997)). Reconstitution of Sendai virus vector was performed according to the methods described in the above references. e/Nef138-β2m/SeVb and e/Env584-β2m/SeVb (collectively 15 called as e/β2m/SeVb) were generated from e/Nef138-β2m/pSeVb and e/Env584-β2m/pSeVb, respectively. Furthermore, A-24-BSPHis/SeVb and A24full/SeVb were generated from A24-BSPHis/pSeVb and A24full/pSeVb, respectively.

Simian kidney cell lines CV-1 and LLCMK2 were cultured in MEM (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml 20 streptomycin, and 100 U/ml penicillin (Life Technologies) (M10). Unless otherwise stated, CV-1 cells were infected with recombinant Sendai virus at each m.o.i and cultured in a serum-free medium for 3 days in following infection with Sendai virus.

25 [Example 6] Recovery and quantification of epitope-linked-β2m (e/β2m)

The culture supernatant of CV-1 cells infected with e/β2m/SeVb or β2m/SeVb was centrifuged at 40,000x g to remove Sendai virus particles and the supernatant was collected.

30 Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the quantification of e/β2m in the culture supernatant. 2.5 µg/ml anti-human β2 microglobulin monoclonal antibody (DAKO) was used as a capture antibody, and 500 ng/ml peroxidase-labeled anti-human β2 microglobulin monoclonal antibody (DAKO) as a detector antibody. TMB 35 peroxidase color development kit (BIO-RAD) was used for color development.

Purified human β 2 microglobulin (Biogenesis) was used as the standard sample.

5 [Example 7] Recovery and purification of secretory form MHC class I/peptide complex

CV-1 cells were co-infected with A24-BSPHis/SeVb and e/Nef138- β 2m/SeVb or e/Env584- β 2m/seVb. The culture supernatant of the infected cells was recovered, centrifuged at 40,000x g to remove Sendai virus particles and the supernatant was collected. 1mM PMSF, 10 3 μ g/ml leupeptin, 3 μ g/ml aprotinin, and 3 μ g/ml pepstatin A were added thereto. The secretion of MHC class I/peptide complex into the supernatant was confirmed by sandwich ELISA. 1 μ g/ml anti-human MHC class I monoclonal antibody (Ancell) was used as a capture antibody, and 250 ng/ml peroxidase-labeled anti-human β 2 microglobulin monoclonal antibody (DAKO) as a detector antibody. TMB peroxidase color development kit (BIO-RAD) was used for color development (Fig. 4).

The culture supernatant was loaded onto a Hitrap-Chelating column (Amersham Pharmacia) filled with NiSO₄ and eluted with a 20 gradient of 0 to 0.5 M imidazole in buffer containing 0.02 M NaHPO₄ and 0.5 M NaCl (pH7.4) using FPLC (Amersham Pharmacia).. After substituting the elution buffer to 10 mM Tris-HCl (pH8.0) using a PD-10 column (Amersham Pharmacia), the solution was ultrafiltrated with Centricon-30 (Amicon) (Fig. 5)

25

[Example 8] Construction of MHC class I/peptide multimer

BirA enzyme (Avidity) was used for the addition of biotin. One mg of MHC class I/peptide complex (1.8 mg/ml) was reacted with 10 μ g BirA at 25°C for 18 hours in 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 50 mM Bicine (pH8.3), 10 mM ATP, 10 mM MgOAc under the existence of 100 μ M biotin.

30 The biotinylated MHC class I/peptide complex was purified on Superdex 200 HR 10/30 column (Amersham Pharmacia) with 20 mM Tris-HCl (pH8.0)-150 mM NaCl by FPLC. Then, the buffer was substituted to PBS containing 2 mM EDTA using a PD-10 column, and adjusted to 2 mg/ml by ultrafiltration using Centricon-30. The biotinylated MHC class I/peptide complex was reacted with Streptavidin-RPE (Molecular

Probes) at a 1:1 ratio of the biotinylated MHC class I/peptide complex to the biotinylation site of streptavidin to form multimers.

[Example 9] Establishment of Nef 138-10-specific CTL clone

5 PBMC of HIV-1-infected subject carrying HLA-A*2402 was cultured overnight at 3x 10⁵/96-well in 100 µl/well R10 medium. On the next day, stimulator cells (autologous PHA-blast activated in RPMI1640 (Sigma) supplemented with 0.2 µg/ml PHA (Sigma) and 10% Lymphocult-T (Bioteest) (R10) overnight, irradiated at 3000 rad, and
10 pulsed with 10 µM Nef138-10 for 1 hour) were added and cultured for 2 weeks in the presence of 1 µg/ml anti-human CD28. The cells were further stimulated with stimulator cells (autologous Epstein-Barr virus transformed B cell line (B-LCL) irradiated at 10,000 rad and pulsed with 10 µM Nef138-10) every 2 weeks. After 2 to 4 stimulations,
15 when CTL activity was confirmed, the cells were cloned.

The cloning was carried out by incubating the cells at 0.8 cells/well with 1x 10⁵ cells/well stimulator cells (autologous B-LCL irradiated at 10,000 rad and pulsed with 10 µM Nef138-10) and 5x 10⁴ cells/well feeder cells (PBMC from normal healthy subject irradiated at 3,000 rad) in the presence of 10% Lymphocult-T and 2.5% PHA-sup (culture supernatant of PBMC (3x 10⁶/ml) from normal healthy subject stimulated with 0.2 µg/ml PHA for 48 hours) for 3 to 4 weeks.

[Example 10] Recognition by CTL of SeV-introduced cells forming membrane-bound form MHC class I/peptide complex

25 CTL ⁵¹Cr release assay was performed as follows. Human CD4⁺ T lymphocyte cell line H9 was cultured in RPMI1160 (Sigma) supplemented with 10% FCS, 100 U/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin (R10). The cells (2x 10³ cells/well; target cells) were labeled with 100 µCi of Na₂⁵¹CrO₄ for 2 hours, washed three times with R10, and pulsed with 10 µM peptide for an hour. When SeV vector-introduced cells were used as target cells, the cells were infected with SeV vectors in combinations as indicated in Fig.6 at m.o.i 10:2, 17 hours before the labeling (namely, 20 hours before the addition of the effector cells). The cells of Example 9 were added as effector cells at each E:T ratios (effector cells:target cells) indicated in Fig.6. The

cells were incubated for 4 hours at 37°C, and the amount of ^{51}Cr released in the culture supernatant was determined using a γ counter. R10 and 4% Triton X-100/PBS were added instead of the effector cells for the determination of Spontaneous release and Maximum release,
5 respectively.

Specific lysis (%) was calculated as (cpm of each sample - cpm of Spontaneous release)/(cpm of Maximum release - cpm of Spontaneous release) \times 100.

Fig.6 shows the result of recognition by CTL of the
10 membrane-bound form MHC class I/peptide complexes. It was revealed that antigen-specific CTL activation could be detected in the cells co-infected with A24full/SeVb and e/Nef138- β 2m/SeVb.

15 [Example 11] Effect of epitope-linked- β 2m recovered from SeV-infected cells

In order to prepare epitope-linked- β 2m produced by SeV-infected cells, H9 cells were infected with e/Nef138- β 2m/SeVb at m.o.i 2. Three days later, culture supernatant was collected and filtered, yielding a solution containing the epitope-linked- β 2m. Similarly as in
20 Example 10, CTL assay was carried out using H9 cells infected with A24full/SeVb as target cells to compare the effect of pulsing with peptides and that with the above-obtained epitope-linked- β 2m-containing solution.

Fig.7 shows the effect of epitope-linked- β 2m. Antigen-specific CTL activity was revealed to be detected upon the addition of the epitope-linked- β 2m recovered from the culture supernatant of SeV-infected cells to the culture solution of the target cells.

30 [Example 12] Detection of epitope-specific CD8-positive T cells by MHC class I/peptide tetramer

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RPE-labeled A24/Nef138-10 tetramer, an MHC class I/peptide tetramer, was added to 1×10^6 peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-1-infected and normal healthy subjects (both carrying HLA-A*2402), and reacted at 37°C for 15 min. The cells were washed
35 once, APC-labeled anti-CD8 was added thereto and reacted at 4°C for 20 min. After washing three times, cells were fixed with PBS

(phosphate-buffered saline) containing 1% paraformaldehyde. PBS containing 2% FCS and 0.1% sodium azide was used for staining and washing. The results are shown in Fig.8. In the figure, 1×10^5 lymphocyte fraction was expanded against A24/Nef138-10 tetramer and 5 anti-CD8, and the numbers indicate the percentage (%) of tetramer-positive T cells among the CD8-positive T cells.

Industrial Applicability

According to the present invention, epitope-linked- β 2m and MHC 10 class I/peptide complexes can be efficiently expressed in mammalian cells. The epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complexes thus obtained are extremely useful for: (1) the detection and quantification of antigen-specific CTL; (2) antigen presentation to antigen-specific CTL utilizing the purified epitope-linked- β 2m 15 protein; and (3) induction of antigen-specific cellular immune response via *in vivo* or *ex vivo* introduction of a virus vector. The epitope-linked- β 2m and MHC class I/peptide complexes that can be obtained by the present invention are useful for the detection and quantification of CTL reactive to autologous antigens, virus antigens, 20 tumor antigens, or the like. In addition, these complexes are useful for the induction of protective immunity against infection with viruses, bacteria, etc., and for immunotherapy against cancers. Moreover, the vectors of the present invention are useful as vectors 25 for gene therapy in the induction of protective immunity for infectious diseases and immunotherapy for cancers.

CLAIMS

1. A mammalian cell-infecting virus vector that encodes an epitope-linked- β 2m in an expressible manner.

5 2. The virus vector of claim 1, wherein said mammalian cell-infecting virus vector is a Paramyxovirus vector.

3. The virus vector of claim 2, wherein said Paramyxovirus is Sendai virus.

10 4. The virus vector of any one of claims 1 to 3, wherein said epitope comprises an amino acid sequence of an epitope peptide presented by an antigen-presenting cell, or a portion thereof.

5 5. The virus vector of any one of claims 1 to 4, wherein said epitope is a partial peptide of a HIV-1 virus protein.

15 6. The virus vector of claim 5, wherein said epitope comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24 or 26, or a portion thereof.

7. The virus vector of any one of claims 1 to 4, wherein said epitope is a partial peptide of a tumor antigen.

20 8. The virus vector of any one of claims 1 to 7, wherein said vector comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 or a repeated sequence thereof between said epitope and β 2m sequences.

9. A method for producing an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of:

(a) introducing the virus vector of any one of claims 1 to 8 into a mammalian cell, and

25 (b) recovering the epitope-linked- β 2m from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof.

10. An epitope-linked- β 2m produced by the method of claim 9.

11. A method for producing a heterodimer comprising an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of:

30 (a) introducing the virus vector of any one of claims 1 to 8 into a mammalian cell, and

(b) recovering the produced heterodimer from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof.

35 12. A method for producing an MHC class I/peptide complex comprising an MHC class I heavy chain and an epitope-linked- β 2m, which comprises the steps of:

(a) introducing the virus vector of any one of claims 1 to 8 into a mammalian cell, and

(b) recovering the produced MHC class I/peptide complex from the mammalian cell introduced with the vector or the culture supernatant thereof.

13. The method of claim 12, wherein said method further comprises the step of introducing a virus vector expressing the MHC class I heavy chain into the mammalian cell.

14. The method of claim 13, wherein said MHC class I heavy chain is a secretory form.

15. The method of claim 14, wherein said MHC class I heavy chain comprises a biotinylation substrate peptide.

16. The method of any one of claims 13 to 15, wherein said MHC class I heavy chain is an A24-restricted HLA class I heavy chain.

17. The method of claim 16, wherein said A24-restricted HLA class I heavy chain is derived from A*2402.

18. The method of claim 15, wherein said method further comprises the steps of biotinyling said MHC class I heavy chain comprising the biotinylation substrate peptide and assembling the biotinylated MHC class I heavy chain in the presence of avidin.

19. An MHC class I/peptide complex produced by the method of any one of claims 12 to 18.

20. The MHC class I/peptide complex of claim 19, wherein said complex is a tetramer.

21. An inducer of antigen-specific cellular immune response comprising the virus vector of any one of claims 1 to 8, the epitope-linked- β 2m of claim 10, or the MHC class I/peptide complex of claim 19 or 20.

22. A pharmaceutical composition comprising the virus vector of any one of claims 1 to 8, the epitope-linked- β 2m of claim 10, or the MHC class I/peptide complex of claim 19 or 20.

23. A mammalian cell, wherein the virus vector of any one of claims 1 to 8 has been introduced.

24. A cell that has the epitope-linked- β 2m of claim 10 on the cell surface.

25. The cell of claim 23 or 24, wherein a gene encoding an MHC

class I heavy chain has been exogenously introduced.

26. The cell of claim 25, wherein said MHC class I heavy chain is a membrane-bound form.

27. The cell of claim 25, wherein said MHC class I heavy chain
5 is a secretory form.

28. The cell of any one of claims 23 to 27, which is a dendritic cell.

29. An inducer of antigen-specific cellular immune response comprising the cell of any one of claims 23 to 28.

10 30. A pharmaceutical composition comprising the cell of any one of claims 23 to 28.

31. A detection agent for antigen-specific T lymphocytes comprising the MHC class I/peptide complex of claim 19 or 20.

~~CONFIDENTIAL~~
ABSTRACT

The present inventors constructed mammalian cell-infecting virus vectors encoding epitope-linked- β 2m and succeeded in 5 large-scale expression of epitope-linked- β 2m in mammalian cells. The present invention provides mammalian cell-infecting virus vectors that encode epitope-linked- β 2m microglobulin (β 2m) and uses thereof. Furthermore, the present invention provides a method for producing 10 an MHC class I/peptide complex using the vector. In particular, a tetramerized MHC class I/peptide complex is useful in detecting epitope-specific CD8-positive T cells. Moreover, the present invention provides cells introduced with the vector. Target cells added with epitope-linked- β 2m produced by the vector of the present invention are also provided. These cells were recognized by 15 antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL). The vectors of this invention and polypeptides obtained via the expression of the vectors are useful in immunotherapy for infections and cancers, and in the detection and quantification of antigen-specific CTL.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.